

Entwicklung eines amperometrischen Biosensors zur Erfassung von Polyphenolen

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Sascha Gabriel Schmidt
aus Köln

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am 30.10.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen
Zweitgutachter: Prof. Dr. Torsten Steinmetzer

Tag der mündlichen Prüfung am 31.10.2012

Für meine Eltern, Sabine und Sonia

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine unermüdliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Weiterhin möchte ich ihm für die Schaffung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen danken.

Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer danke ich für die Übernahme des Korreferates. Außerdem danke ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Frau Prof. Dr. Petersen und Herrn Prof. Dr. Kuschinsky.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß, den wir während, aber auch nach der Arbeitszeit hatten. Ich danke Frank Balzer für die ausgezeichnete IT-Unterstützung und Erwin Schott, der mich beim Aufbau der Messapparaturen unterstützte.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meiner Familie und Freunden bedanken, die mich immer wieder motiviert haben und ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders herzlich danke ich Sabine für ihre Geduld und dass sie mir den Freiraum verschaffte, diese Arbeit zu schreiben. Ihr sei außerdem für das Korrekturlesen gedankt. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Tochter Sonia, die mich mit ihrem Lächeln und durch ihr Dasein immer wieder motiviert hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren und versehentlich nicht erwähnt worden sind.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Technik	1
1.1.1	Elektrochemische Detektion.....	1
1.1.1.1	Grundlagen	2
1.1.1.2	Amperometrie.....	4
1.1.1.2.1	Arbeitselektrode.....	5
1.1.1.2.2	Referenzelektrode	5
1.1.1.3	Cyclische Voltammetrie	6
1.1.2	Dickschichttechnik (TFT).....	8
1.1.3	Biosensoren.....	10
1.1.3.1	Definition eines Biosensors	10
1.1.3.2	Entwicklungen in der Biosensorik.....	11
1.1.3.3	Thermische Biosensoren.....	14
1.1.3.4	Piezoelektrische Biosensoren	15
1.1.3.5	Optische Biosensoren	15
1.1.3.5.1	Evaneszentfeldsensoren	15
1.1.3.5.2	Indikatorsensoren (Optoden, Optroden)	16
1.1.3.5.3	Reflektometrische Interferenzsensoren.....	17
1.1.3.6	Elektrochemische Biosensoren	17
1.1.3.6.1	Konduktometrischer Biosensor.....	17
1.1.3.6.2	Potentiometrischer Biosensor	18
1.1.3.6.3	Amperometrischer Biosensor	18
1.1.4	Flow Injection Analysis (FIA).....	19
1.2	Biologie.....	20
1.2.1	Enzyme.....	20
1.2.1.1	Laccase (EC 1.10.3.2)	21
1.2.1.2	Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4).....	23
1.2.1.3	Meerrettich-Peroxidase (1.11.1.7)	23
1.2.2	Immobilisierungstechniken	24
1.2.2.1	Ionische/adsorptive Bindung	25
1.2.2.2	Kovalente Bindung.....	25
1.2.2.2.1	Photolinker.....	26
1.2.2.3	Quervernetzung	27
1.2.2.4	Membranabtrennung.....	27
1.2.2.5	Matrixeinhüllung	27
1.2.2.5.1	Polylactid	27
1.2.2.5.2	Emulgatoren.....	30
1.2.2.5.3	Carbon Nanotubes	31

1.3	Analyte	32
1.3.1	Polyphenole	32
1.3.1.1	Flavonoide	33
1.3.1.2	Phenolcarbonsäuren	34
1.3.1.3	Pharmakologische Wirkung der Polyphenole	35
1.3.2	Realproben	36
1.3.2.1	Fruchtsäfte	36
1.3.2.1.1	Aronia (Apfelbeere)	36
1.3.2.1.2	Cranberry (großfrüchtige Moosbeere)	37
1.3.2.1.3	Polyphenole in Aronia und Cranberry	38
1.3.2.2	Tee	40
1.3.2.2.1	Die Teepflanze	40
1.3.2.2.2	Herstellung von Tee	40
1.3.2.2.3	Polyphenole in Tee	41
1.4	Ziel dieser Arbeit	42
2	MATERIAL UND METHODEN	44
2.1	Material	44
2.1.1	Chemikalien	44
2.1.2	Polylactide	46
2.1.3	Enzyme	46
2.1.4	Referenzsubstanzen	46
2.1.5	Realproben	47
2.1.6	Lösungen und Puffer	48
2.1.7	Geräte	51
2.1.8	Schläuche	52
2.2	Systemaufbau	52
2.2.1	Systemaufbau mit Wall-Jet-Zelle	52
2.2.2	TFT-Sensoren	55
2.2.3	Messungen mit TFT-Sensoren	57
2.2.4	Bestimmung der Fließgeschwindigkeit	58
2.3	Methoden	59
2.3.1	Immobilisierung von Enzymen auf NHS-HiTrap®-Kartuschen	59
2.3.2	Reinigung der Oberflächen der Makroelektroden	59
2.3.3	Reinigung der Dickschichtsensoren	60
2.3.4	Messungen mit einer NHS-HiTrap®-Kartusche	60
2.3.5	Herstellung von Enzym-Lösungen	61
2.3.5.1	Peroxidase in Pufferlösung für NHS-HiTrap®-Kartuschen	61

2.3.5.2	Laccase aus <i>Trametes versicolor</i> in Pufferlösung	61
2.3.5.3	Laccase aus <i>Agaricus bisporus</i> in Pufferlösung	62
2.3.5.4	Laccase aus <i>Rhus vernificera</i> in Pufferlösung	62
2.3.5.5	Glucoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i> in Pufferlösung	62
2.3.6	Herstellung von funktionalisierten Carbon Nanotubes	62
2.3.6.1	Funktionalisierung mittels Säure und Ultraschallbad	62
2.3.6.2	Funktionalisierung mit konzentrierter Salpetersäure	63
2.3.6.3	Funktionalisierung mit konz. Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid.....	64
2.3.7	Herstellung der PLA-Probe	64
2.3.7.1	Lösung des PLAs.....	64
2.3.7.2	Herstellung einer leitfähigen Probe	64
2.3.7.3	Funktionalisierung mit einer Enzym-Lösung	65
2.3.7.4	Zugabe von Emulgatoren zu den PLA-Proben	65
2.3.8	Beschichtung der Makroelektroden mittels PLA-Emulsion	65
2.3.8.1	Aufbringen der PLA-Emulsion mittels Spritze	65
2.3.8.2	Aufbringen der PLA-Emulsion mittels Dippen	65
2.3.8.3	Aufbringen der PLA-Emulsion mittels Pipette.....	66
2.3.9	Beschichtung von Dickschichtelektroden mittels PLA-Emulsion.....	66
2.3.10	Beschichtung von Elektroden mittels APTES und GDA	66
2.3.11	Beschichtung von Dickschichtelektroden mittels Photolinker	67
2.3.11.1	Beschichtung von Laccase mit Sulfo-HSAB.....	67
2.3.11.2	Beschichtung von Glucoseoxidase mit Sulfo-HSAB	68
2.3.11.3	Beschichtung von Laccase mit FNPA	68
2.3.11.4	Beschichtung von Glucoseoxidase mit FNPA.....	68
2.3.12	Überprüfung der Immobilisierung auf Kartuschen mittels TMB	68
2.3.13	Überprüfung der Immobilisierung von Laccase mittels ABTS.....	69
2.3.14	Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu	70
2.3.15	Herstellung von Realproben.....	70
2.3.15.1	Teeproben	71
3	ERGEBNISSE	72
3.1	Tests mit der Wall-Jet Zelle	72
3.1.1	Messungen von Polyphenolen ohne Enzym	72
3.1.1.1	Amperometrie mit verschiedenen Potentialen und Arbeitselektroden.....	72
3.1.1.2	Einfluss von verschiedenen Puffern	73
3.1.1.3	Signal des Produktes bei der enzymatischen Reaktion.....	75
3.1.2	Versuche mit NHS-HiTrap®-Kartuschen	76
3.1.2.1	Überprüfung der Immobilisierung des Enzyms Laccase auf die Kartusche	76
3.1.2.2	Messung von Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und p-Benzochinon.....	76
3.1.2.3	Linearität des Messsystems	79

3.1.2.3.1	Messungen bei dem Potential $E = -150 \text{ mV}$	79
3.1.2.3.2	Messungen bei dem Potential $E = -250 \text{ mV}$	81
3.1.2.3.3	Vergleich der Messergebnisse bei unterschiedlichen Potentialen.....	84
3.1.2.4	Amperometrische Messungen	84
3.1.2.5	Amperometrische Messung von Hydrochinon	85
3.1.2.6	Amperometrische Messung von 1,2-Dihydroxybenzen	87
3.1.2.7	Amperometrische Messung von Gallussäure	87
3.1.2.8	Amperometrische Messung von Kaffeesäure	88
3.1.2.9	Amperometrische Messung von DL-DOPA.....	89
3.1.2.10	Beobachtungen zur NHS-HiTrap®-Kartusche	90
3.1.2.11	Substratspezifität des immobilisierten Enzyms Laccase	91
3.1.3	Versuche mit Polylactiden	92
3.1.3.1	Löslichkeit von verschiedenen Polylactiden.....	92
3.1.3.2	Herstellung eines Polymerfilms auf der Elektrodenoberfläche	93
3.1.3.3	Erhöhung der Leitfähigkeit von PLA	94
3.1.3.4	Vergleich Platin- und Glassy-Carbon-Elektrode	95
3.1.3.5	Überprüfung der Linearität mittels Referenzsubstanz	96
3.1.4	Messungen PLA-beschichteter Enzym-Elektroden	97
3.1.4.1	Messungen mit beschichteter Elektrode und Enzymkartusche.....	97
3.1.4.2	Puffersysteme für Laccase.....	98
3.1.4.3	Cyclische Voltammetrie	99
3.1.4.4	Tests mit verschiedenen Polymer-Zusammensetzungen	100
3.1.4.5	Mehrfachmessungen von Hydrochinon	102
3.1.4.6	Messungen mit negativen Potentialen	104
3.1.4.7	Verwendung von nicht konservierten Fließmitteln	106
3.1.4.8	Verwendung von Emulgatoren zur Stabilisierung der PLA-Zusammensetzung	107
3.1.4.9	Verwendung von Carbon Nanotubes anstelle von Aktivkohle.....	108
3.1.4.10	Vergleich von verschiedenen Laccasen.....	112
3.1.4.11	Vergleich von verschiedenen Fließmittel	113
3.1.4.12	Quantitative Bestimmung von Referenzsubstanzen	114
3.1.4.12.1	Quantitative Bestimmung von Hydrochinon.....	114
3.1.4.12.2	Quantitative Bestimmung von 1,2-Dihydroxybenzen	117
3.1.4.12.3	Quantitative Bestimmung von Gallussäure	118
3.1.4.12.4	Quantitative Bestimmung von Kaffeesäure.....	119
3.1.4.12.5	Quantitative Bestimmung von DL-DOPA	120
3.1.4.13	Lagerstabilität	122
3.1.5	Amperometrische Detektion von Polyphenolen mittels des Enzyms Glucoseoxidase	123
3.1.5.1	Test von Hydrochinon in TRIS-Puffer	123
3.1.5.2	Tests mit immobilisierter Glucoseoxidase auf GC-Elektroden.	124
3.2	TFT-Sensoren mit PLA-Beschichtung.....	125
3.2.1	Cyclische Voltammetrie.....	126

3.2.2	Amperometrie	128
3.3	Anderen Beschichtungsstrategien bei TFT-Sensoren	130
3.3.1	Vergleich der Beschichtungen APTES, Sulfo-HSAB und FNPA.....	130
3.3.2	Beschichtung mit FNPA	131
3.3.2.1	Vergleich von verschiedenen Laccasen und BVT-Sensoren	131
3.3.2.2	Verwendung von Glucoseoxidase	133
3.3.2.3	Cyclische Voltammetrie	134
3.3.2.4	Amperometrische Messungen von Referenzsubstanzen.....	135
3.3.2.4.1	Hydrochinon	135
3.3.2.4.2	1,2-Dihydroxybenzen	136
3.3.2.4.3	Gallussäure	137
3.3.2.5	Amperometrischen Messungen von Realproben	139
3.3.2.5.1	Bestimmung der Realproben per Referenzmethode	139
3.3.2.5.2	Bestimmung der Teeproben per Biosensor.....	140
3.3.2.5.3	Vergleich der ermittelten Werte für Tee	141
3.3.2.5.4	Bestimmung der Saftproben per Biosensor	142
3.3.2.5.5	Vergleich der ermittelten Werte für die Saftproben.....	143
3.3.2.6	Lagerstabilität	144
3.4	REM-Aufnahmen.....	145
3.4.1	REM-Aufnahmen einer ungenutzten PLA-beschichteten Elektrode	145
3.4.2	REM-Aufnahmen benutzter PLA-beschichteter Elektroden.....	147
4	DISKUSSION	150
4.1	Verwendung von PLA als Immobilisierungsreagenz.....	150
4.1.1	Möglichkeiten zur Verflüssigung von PLA.....	150
4.1.1.1	Unterschiede in der Löslichkeit verschiedener PLAs	151
4.1.2	Die Adhäsion von PLA an Glassy Carbon Elektroden	152
4.1.2.1	Unterschiedliche Adhäsionstheorien	152
4.1.2.2	Glassy Carbon und seine Oberfläche.....	153
4.1.2.3	Adhäsive Eigenschaften von PLA	153
4.1.2.4	Erläuterung der unterschiedlichen Adhäsion der verschiedenen PLAs	154
4.1.3	Herstellung eines elektrisch leitfähigen PLA-Polymers.....	155
4.1.3.1	Verwendung von Kupfer als elektrischer Leiter	155
4.1.3.2	Verwendung von Aktivkohle als elektrischer Leiter	156
4.1.3.3	Erläuterung der unterschiedlichen Basislinien	156
4.1.3.4	Verwendung von Carbon Nanotubes (CNT) als elektrischer Leiter.....	157
4.2	Immobilisierungsstrategien bei TFT-Sensoren	158
4.2.1	Immobilisierung mit PLA.....	158

4.2.2	Vergleich der Beschichtungsstrategien mit APTES, Sulfo-HSAB und FNPA.....	159
4.2.2.1	Immobilisierung mit APTES	159
4.2.2.2	Immobilisierung mit Photolinkern.....	160
4.2.2.2.1	Immobilisierung auf Kohlenstoff-Elektroden mit Sulfo-HSAB	160
4.2.2.2.2	Immobilisierung auf Kohlenstoffelektroden mit FNPA	161
4.2.2.3	Unterschiedliche Ergebnisse aufgrund der Beschichtungsstrategien mit APTES, Sulfo-HSAB und FNPA	161
4.2.3	Verwendung unterschiedlicher Elektroden für die FNPA-Beschichtung	162
4.3	Verwendung von Laccasen	163
4.3.1	Laccase aus <i>Rhus vernicifera</i>	163
4.3.1.1	Verwendung von Laccase aus <i>Rhus vernicifera</i> auf TFT-Sensoren	163
4.3.2	Laccasen aus <i>Agaricus bisporus</i> und <i>Trametes versicolor</i>	164
4.3.2.1	Verwendung der Laccasen auf Makroelektroden	165
4.3.2.2	Verwendung der Laccasen auf TFT-Sensoren.....	166
4.4	Verwendung von Glucoseoxidase	167
4.5	Messungen von Polyphenolen mit Makroelektroden	170
4.6	Messungen von Polyphenolen mit TFT-Sensoren.....	171
4.7	Messungen von Realproben mit TFT-Sensoren.....	172
4.7.1	Verschiedene Grüntee-Sorten	173
4.7.2	Aroniasaft und Cranberrysaft	174
4.8	Stabilität des Biosensors.....	175
4.8.1	Lagerstabilität der mit PLA-beschichteten GC-Elektrode.....	175
4.8.2	Stabilität des TFT-Biosensors	176
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	177
6	LITERATURVERZEICHNIS	182
	LEBENS LAUF	193

ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat]
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AU	arbitrary unit
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CNT	Carbon Nanotubes
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
E _o	Standardpotential
E	Potential der Arbeitselektrode
F	Faradaykonstante
FNPA	4-Fluoro-3-Nitrophenyl-azid
g	Gramm
GDA	Glutardialdehyd
GC	Glassy Carbon
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
I	Strom
kDa	Kilodalton
M	Molarität, molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MWCMT	Multi-walled Carbon Nanotubes
n.b.	nicht bestimmbar
nA	Nanoampere
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
p.a.	pro analysis
pH	pondus hydrogenii
ppm	parts per million

RT	Raumtemperatur
t	Zeit
T	Temperatur
TMB	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
SDS	Natriumdodecylsulfat
SWCNT	Single-walled Carbon Nanotubes
U	Spannung
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
z	Ladungszahl
z.B.	zum Beispiel
α	Dissoziationsgrad
μA	Mikroampere
μM	mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Temperatur, Grad Celsius

1 Einleitung

Während in den Anfängen der Lebensmittelanalytik vor allem die Nährwerte und Vitamine untersucht worden, sind seit den 1990er Jahren vermehrt die sekundären Pflanzenstoffe aufgrund deren gesundheitlicher Wirkung auf den Menschen in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung gerückt. Sekundäre Pflanzenstoffe dienen der Pflanze als Farb-, Abwehr- und Schutzstoffe oder als Wachstumsregulatoren. Sie kommen nur in geringen Mengen in den Pflanzen vor [Hahn et al., 2005]. Typische sekundäre Pflanzenstoffe sind zum Beispiel die Cysteinsulfoxide in verschiedenen Allium-Arten [Keusgen, 1999] oder aber auch Polyphenole, die quasi ubiquitär in allen Pflanzen vorkommen [Baltes, 2000]. Gerade mit Hilfe der Polyphenole versucht heutzutage die Lebensmittelindustrie für ihre Produkte ein gesundes Image zu schaffen. Dies lässt sich unter dem Begriff „Functional Food“ subsumieren. Ein typisches Beispiel ist hierfür die Schokolade, bei denen die Herstellungsprozesse soweit optimiert worden sind, dass ein möglichst hoher Polyphenol-Anteil in der Schokolade erhalten bleibt [Latnser, 2007]. Dafür bedarf es einer besonders schonenden Fermentation, die in den Ursprungsländern durchgeführt wird. Um direkt vor Ort die Kakaobohnen mit dem höchsten Polyphenol-Gehalt aussortieren und einer besonderen Behandlung zuführen zu können, ist eine Analysetechnik nötig, die schnell, robust und ohne großen apparativen Aufwand an verschiedenen Orten eingesetzt werden kann. Für diesen Einsatz sind Biosensoren aufgrund ihrer Selektivität und einfachen Handhabung besonders gut geeignet. Weitere pflanzliche Lebensmittel, indem hohe Polyphenolgehalte gefunden werden können, sind Tee (*Camellia sinensis* L.) und Trauben (*Vitis vinifera* L.) bzw. aus Trauben hergestellte Produkte wie Traubensaft, Wein und Traubenkernöl [Baltes, 2000]. Auch hier ist der Herstellungsprozess entscheidend für den Polyphenolgehalt im Endprodukt. Als biologische Komponente eines Polyphenol-Biosensors kommen Enzyme der Klasse der Oxidoreduktasen, wie zum Beispiel das Enzym Laccase, in betracht, das gut verfügbar ist und auf äußere Einflüsse relativ robust reagiert [Gomes und Rebelo, 2003].

1.1 Technik

1.1.1 Elektrochemische Detektion

Neben den klassischen Analysenverfahren, wie zum Beispiel dem nasschemischen und photometrischen Analysenverfahren, hat sich im Laufe der Zeit eine weitere Analysenmethode in der chemischen Analytik durchgesetzt: Die elektrochemische Detektion.

Der Vorteil der elektrochemischen Detektion liegt im Vergleich zu den klassischen Analysenmethoden in deren Empfindlichkeit, deren Anwendbarkeit und deren Einfachheit. Die vier häufigsten Methoden zur elektrochemischen Detektion sind:

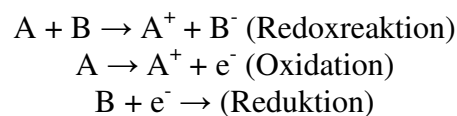
- Amperometrie
- Konduktometrie
- Potentiometrie
- Voltammetrie/Polarographie

Bei der Amperometrie wird die Stromstärke bei einem konstant angelegten Potential zwischen zwei Elektroden gemessen. Im Gegensatz dazu wird bei der Konduktometrie die Leitfähigkeit in einer Lösung vermessen. Die Potentiometrie ist eine stromlose Messmethode und wahrscheinlich die am häufigsten verwendete elektrochemische Detektion der Welt: Die pH-Messung mittels Einstabmessketten erfolgt nach diesem Prinzip. Bei der Voltammetrie wird die Stromstärke in Abhängigkeit des Potentials vermessen. Polarographie und Voltammetrie unterscheiden sich darin, dass bei der Voltammetrie stationäre Elektroden verwendet werden, während in der Polarographie eine Quecksilber-Tropf-Elektrode verwendet wird [Henze, 2001].

1.1.1.1 Grundlagen

Die Übertragung von Elektronen bei Redoxreaktionen findet nicht nur direkt vom Reaktionspartner zu Reaktionspartner statt, sondern kann auch über elektrische Leiter stattfinden. Eine Redoxreaktion kann in zwei Teilreaktionen geteilt werden, in die Oxidation und die Reduktion, die jeweils räumlich getrennt an Elektroden stattfinden.

Reaktionsgleichung 1:



Ein System, indem Elektroden, die elektrische Leiter sind, in eine geeignete Elektrolytlösung eintauchen, bezeichnet man als elektrochemische Zelle. Taucht eine Metallelektrode in eine Lösung mit Ionen des gleichen Metalls ein, bildet sich ein Einzelpotential E aus, welches eine elektrochemische Halbzelle darstellt. Diese elektrochemische Halbzelle bezeichnet man als Elektrode 1. Art. Das Einzelpotential, welches sich in der Halbzelle ausbildet, kann jedoch nicht direkt gemessen werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, stromlos die Differenz zweier Einzelpotentiale, also zweier Halbzellen, zu messen. Dies führt zu der Problematik, dass man die Methode standardisieren muss, um absolute, vergleichbare Werte zu erhalten. Als Standard wurde das Potential einer Wasserstoffelektrode willkürlich bei allen

Temperaturen auf den Wert 0 V festgesetzt. Bei der Standardwasserstoffelektrode handelt es sich um ein platinisiertes Platinblech, welches von Wasserstoff mit einem Druck von 101,3 kPa (1 atm) umspült wird und in eine Säurelösung mit einer Wasserstoffionenaktivität von 1,00 eintaucht. Das Platinblech wird durch elektrochemische Reduktion mit H_2PtCl_6 beschichtet und man erhält das sogenannte Platinschwarz, welches eine große Oberfläche besitzt. An einer platinisierten Platinelektrode reagieren spontan und reversibel Wasserstoff-Ionen mit Elektronen zu Wasserstoff. Verwendet man die Standardwasserstoffelektrode als Bezugselektrode, so ist es möglich eine Spannungsreihe von Metallen aufzustellen, indem man die Potentialdifferenzen zwischen dem Redoxpaar Metall/Metall-Ion und Standardwasserstoffhalbzelle misst.

Tabelle 1 Spannungsreihe: Auswahl verschiedener Redoxpaare für Standardbedingungen

Metall	Metall-Ion	E^0 in V
Li	Li^+	-3,04
Mg	Mg^{2+}	-2,37
Al	Al^{3+}	-1,66
Zn	Zn^{2+}	-0,76
Fe	Fe^{2+}	-0,45
H_2	2H^+	0,00
Cu	Cu^{2+}	+0,34
Ag	Ag^+	+0,80
Hg	Hg^{2+}	+0,85
Au	Au^{2+}	+1,50

Diese Spannungsreihe gilt jedoch nur für Standardbedingungen, also für Standarddruck und Standardtemperatur. Des Weiteren beträgt die Aktivität der Lösung 1 mol/l. Im Allgemeinen liegen aber von 1 mol/l abweichende Konzentrationen oder angenäherte Konzentrationen vor. Die Konzentration beeinflusst jedoch das Potential von Halbzellen. Zwischen zwei Halbzellen, welche das gleiche Element und die gleiche Elektrolytlösung enthalten und sich nur in der Konzentration der Elektrolytlösung unterscheiden, bilden sich eine Spannung. Die Spannung beträgt bei Systemen, die ein Elektron übertragen, pro Zehnerpotenz Konzentrationsunterschied 0,059 V. Diese Konzentrationsabhängigkeit des Redoxpotentials wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben, die sich thermodynamisch ableiten lässt.

Formel 1: Nernst-Gleichung

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

E_0 = Standardpotential, R = allgemeine Gaskonstante, F = Faraday-Konstante, T = Temperatur, z = Ladungszahl, $[Ox]$ = Konzentration der oxidierten Form, $[Red]$ Konzentration der reduzierten Form

Setzt man nun in die Gleichung den Wert von R ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), die Standardtemperatur von 298 K , die Faraday-Konstante von 96487 C mol^{-1} und den Umrechnungsfaktor des natürlichen in den dekadischen Logarithmus (2,3) ein, so ergibt sich für 25°C folgende Gleichung:

Formel 2:

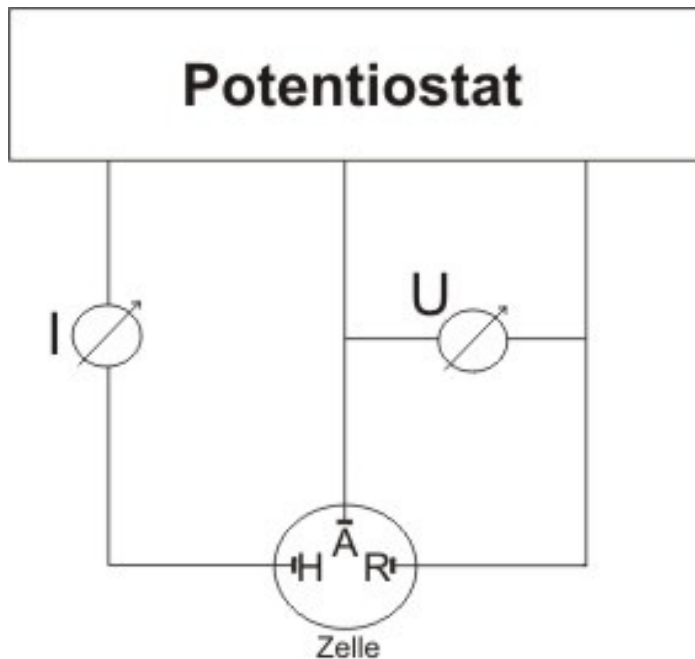
$$E = E_0 + \frac{0,059 \text{ V}}{z} \cdot \lg \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Unter Berücksichtigung des Standardpotentials wird das Potential des Redoxsystems durch das vorliegende Konzentrationsverhältnis bestimmt.

1.1.1.2 Amperometrie

Die Amperometrie ist eine Weiterentwicklung der Gleichstrompolarographie. Auf der Basis einer Zwei-Elektroden-Anordnung, die aus Arbeits- und Referenzelektrode besteht, wird bei einem konstanten Potential an der stationären Arbeitselektrode der fließende Diffusionsstrom gemessen [Haase, 2002]. Dieser ist im Grenzbereich am empfindlichsten und ist proportional der Konzentration des Analyten. Der Ablauf einer amperometrischen Detektion kann in drei Schritte eingeteilt werden. Zuerst werden die Analyten aus der Lösung durch Konvektion, Diffusion oder durch Migration zur Elektrodenoberfläche transportiert. Dann erfolgt der Elektronentransfer zwischen Analyten und Elektrode an der Phasengrenze Lösung/Elektrode. Und im letzten Schritt findet der Abtransport der Reaktionsprodukte von der Elektrodenoberfläche, um eine Passivierung der Elektroden zu verhindern.

Neben der klassischen Zwei-Elektroden-Anordnung wird sehr häufig eine Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Bei dieser Anordnung wird zusätzlich eine Hilfselektrode in das System eingebracht. Durch die Hilfselektrode lässt sich der Zellstrom ableiten, um die Referenzelektrode, die in der Zwei-Elektroden-Anordnung den Strom ableitet, stromlos zu halten [Hauser, P. et al. 1999]. Dadurch werden Diffusionspolarisation der Referenzelektrode und stromflussbedingter Spannungsabfall in der Lösung verhindert. Zu den wichtigsten Anwendungsgebieten zählen neben der medizinischen Diagnostik die Lebensmittelanalytik sowie die Prozess- und Umweltkontrolle [Henze, 2001].

**Abbildung 1.1.1**

Schematische Darstellung einer amperometrischen Messanordnung mit drei Elektroden

H: Hilfs Elektrode

R: Referenzelektrode

A: Arbeitselektrode

1.1.1.2.1 Arbeitselektrode

Die Arbeitselektrode ist die Elektrode, an der in kontrollierter Weise die elektrochemischen Vorgänge ablaufen. Mit Hilfe einer Referenzelektrode wird das Potential der Arbeitselektrode gemessen und durch einen Potentiostaten geregelt. Im Allgemeinen werden zur Messung von elektrochemischen Prozessen inerte Arbeitselektroden verwendet. Als inerte Materialien werden für Arbeitselektroden Gold, Platin oder Glaskohlenstoff (Glassy Carbon/GC) verwendet, aber auch Quecksilber (Quecksilbertropfelektrode für die Polarographie). Abhängig davon, ob an der Arbeitselektrode Stoffe oxidiert oder reduziert werden, dient die Arbeitselektrode als Elektronenakzeptor oder als Elektronendonator [Henze, 2001].

1.1.1.2.2 Referenzelektrode

Die Referenzelektrode (auch Bezugs- oder Vergleichselektrode) ist eine Elektrode mit konstantem Gleichgewichtspotential, welches sich schnell und reproduzierbar einstellt, und wird als Bezugspunkt für die Messung von relativen Potentialen anderer Elektroden verwendet. Da nur Potentialdifferenzen zwischen zwei Elektroden bestimmt werden können, ist es daher bei Messungen nötig, immer die verwendete Referenzelektrode zu benennen.

Man unterscheidet bei den Referenzelektroden zwischen „Elektroden erster Art“ und „Elektroden zweiter Art“. Bei den „Elektroden erster Art“ handelt es sich um Metallionenelektroden, deren Potential von der Konzentration der Metallionen in der Lösung abhängt. Es stellt sich ein stabiles und reproduzierbares Elektrodenpotential ein, wenn die

Metallionenkonzentration konstant ist. Ein Beispiel für eine „Elektrode erster Art“ ist die Kupfer/Kupfersulfat-Elektrode (Cu/CuSO_4).

Deutlich häufiger werden in der Praxis jedoch „Elektroden zweiter Art“ verwendet. Dies ergibt sich durch den einfacheren Aufbau und der ebenfalls schnell und reproduzierbaren Einstellung des Gleichgewichtspotentials. Eine „Elektrode zweiter Art“ ist eine Metallionenelektrode, bei der die Metallionen in der Lösung im Gleichgewicht mit einem schwerlöslichen Salz des Metalls stehen. Die Lösung enthält zusätzlich Anionen des schwerlöslichen Salzes. Die potentialbestimmende Konzentration der Metallionen in der Lösung wird dann von der Konzentration der Anionen und dem Löslichkeitsprodukt des schwerlöslichen Salzes bestimmt. Dadurch wird das Elektrodenpotential von der Konzentration der Anionen in der Lösung abhängig. Beispiele für eine „Elektrode zweiter Art“ sind:

- die Silber-Silberchlorid-Elektrode ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$)
- die Kalomel- oder Quecksilber-Quecksilberchlorid-Elektrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$)

Die Wahl der zu verwendenden Referenzelektrode hängt von den in der Lösung herrschenden Bedingungen ab. In sauren Lösungen werden häufig Kalomel- oder Silber-Silberchlorid-Elektroden verwendet. Aufgrund der Giftigkeit des Quecksilbers und des Einzugs des Nachhaltigkeitsgedanken auch in die Forschung werden Silber-Silberchloridelektroden bevorzugt. In alkalischen Lösungen ist die Verwendung von Silber-Silberchlorid-Elektroden jedoch nur bedingt einsetzbar, da die Hydroxidionen in die Referenzelektrode diffundieren können und somit das Potential verfälschen können.

Für bestimmte Anwendungen werden oft „Pseudo-Referenzelektroden“ verwendet. „Pseudo-Referenzelektroden“ bestehen meistens aus Metalldrähten, die direkt in die Elektrolytlösung eingetaucht werden. Dabei stellt sich ein konstantes Potential ein, welches jedoch unbekannt ist und von der Zusammensetzung der Elektrolytlösung abhängt. Der Vorteil solcher Elektroden ist, dass keine Verunreinigungen (z.B. Chloridionen) in Lösungen eingebracht werden [Skoog/Leary, 1996].

1.1.1.3 Cyclische Voltammetrie

Die cyclische Voltammetrie wird auch populärwissenschaftlich als die Spektroskopie des Elektrochemikers bezeichnet, obwohl es sich nicht um eine spektroskopische Methode handelt. Vielmehr soll die Leistungsfähigkeit der cyclischen Methode hervorgehoben werden. Es wird eine Ausgangsspannung angelegt, die linear oder treppenförmig zu einer Endspannung verändert wird. Von der Endspannung kehrt man wieder zurück zur

Ausgangsspannung. Die dabei entstehenden Ströme werden gemessen und als Stromstärke/Stromspannungs-Diagramm (i/E-Diagramm) dargestellt.

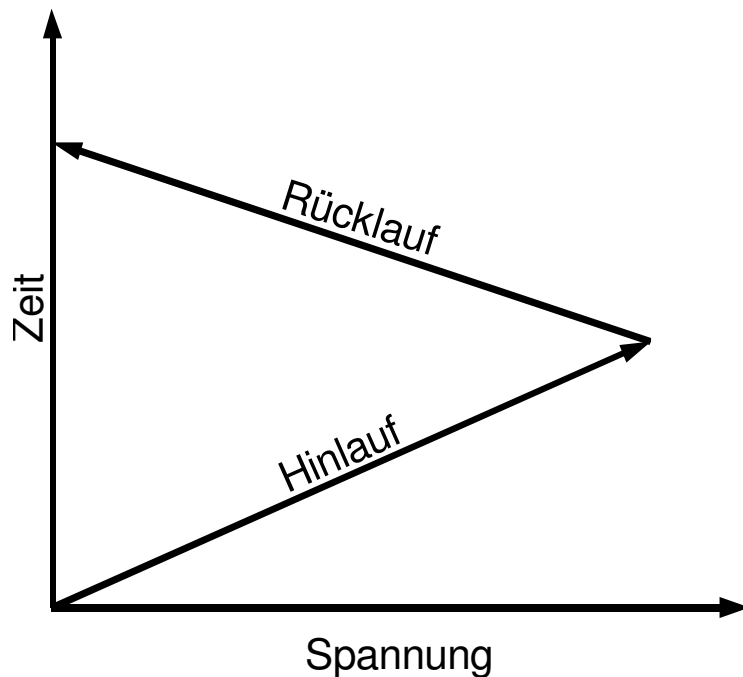


Abbildung 1.1.2 Verlauf der Spannung über den Messzeitraum

Man unterscheidet zwischen reversiblen und irreversiblen elektrochemischen Reaktionen. Bei einer irreversiblen Reaktion gibt es im Voltammogramm keinen Rücklaufpeak (siehe Abbildung 1.1.3). Dafür gibt es zwei mögliche Gründe. Zum einen kann eine Fängersubstanz enthalten sein, die mit dem gebildeten Produkt abreagiert. Zum anderen kann das erzeugte elektrochemische Produkt instabil sein. Wenn die elektrochemische Umsetzung nicht kinetisch gehemmt ist, also bei der reversiblen elektrochemischen Reaktion, entspricht die Differenz des anodischen und kathodischen Peakpotentials 58 mV dividiert durch die Anzahl der übertragenen Elektronen (z).

Formel 3:

$$\Delta E_p = \frac{58}{z} \text{ mV}$$

Die cyclische Voltammetrie dient hauptsächlich zur Untersuchung von reversiblen Elektrodenprozessen und kinetischen Studien [Kissinger/Heineman, 1983].

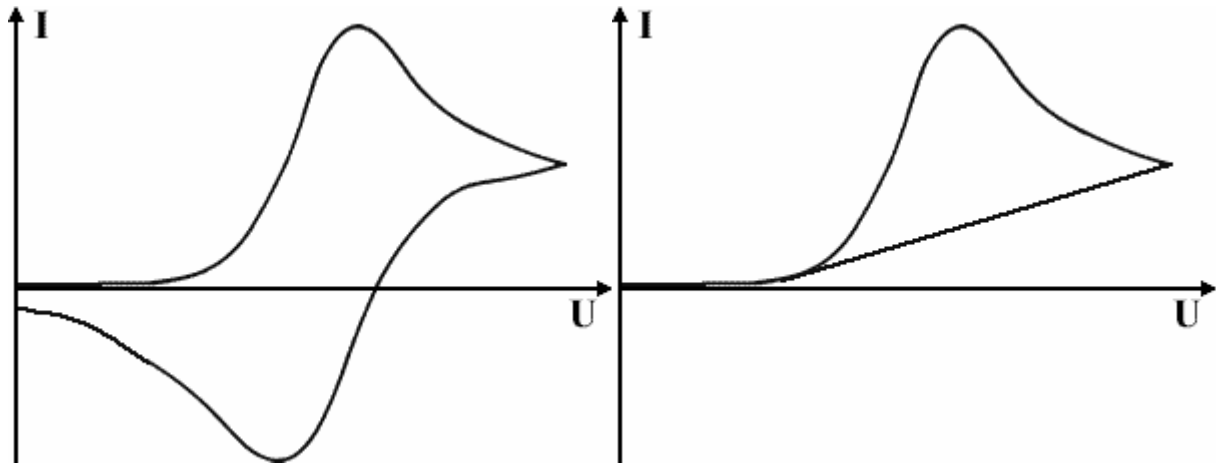


Abbildung 1.1.3 links: Darstellung eines zyklischen Voltammogramms eines reversiblen Prozesses
rechts: Darstellung eines zyklischen Voltammogramms eines irreversiblen Prozesses

1.1.2 Dickschichttechnik (TFT)

Die Dickschichttechnik (Thick Film Technology/TFT) ist ein Verfahren zur Herstellung keramischer elektronischer Verdrahtungsträger. Als Trägermaterialien für die Leit-, Isolations- und Widerstandspasten kommen gebrannte Keramiksubstrate aus Aluminiumoxid, Aluminiumnitrit oder Glas zum Einsatz. Als Leitbahnmateriale werden üblicherweise Gold, Silber und Platin- sowie Palladiumlegierungen als Widerstandsmaterial Rutheniumoxid verwendet. Die Schichten werden sequentiell im Siebdruck aufgebracht. Nach einer Trocknung bilden sich während eines abschließenden Einbrandes bei Temperaturen zwischen 500 und 850°C die typischen Schichteigenschaften wie elektrischer Widerstand und Haftfestigkeit aus. Diese Technologiefolge erlaubt eine sehr einfache und flexible Herstellung von Multilayern mit mehreren Leitebenen [Luniak, 2012].

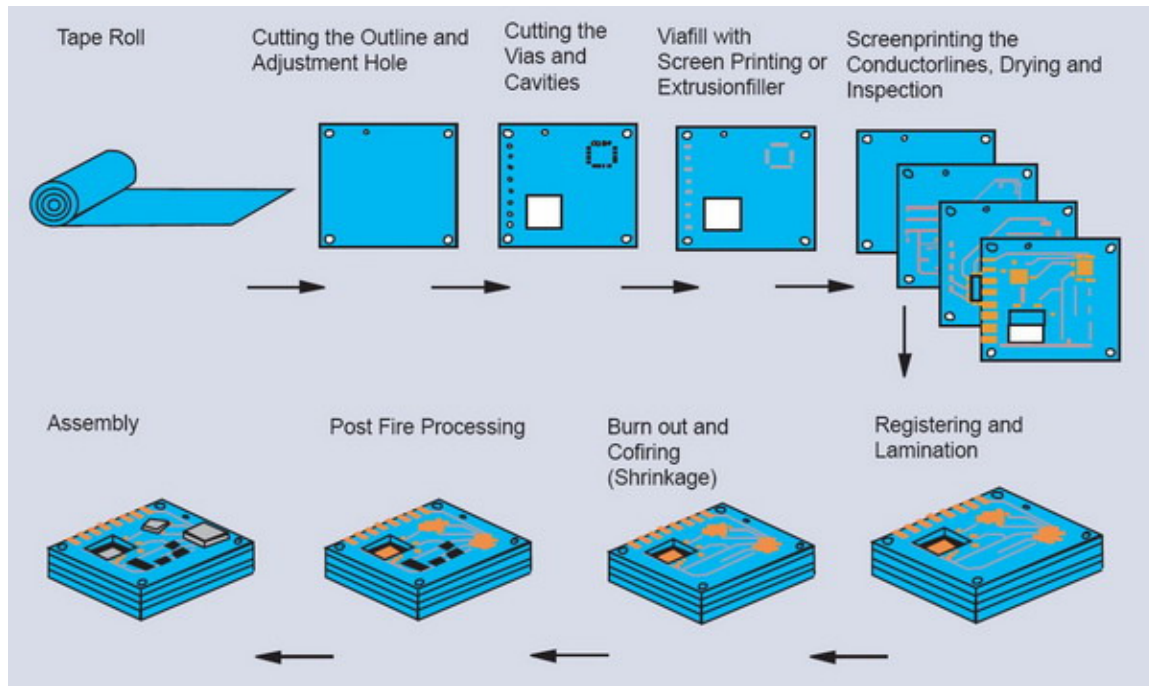


Abbildung 1.1.4 Beispiel für die Herstellung von Dickschichtsensoren
(Quelle: Luniak, TU Dresden, 2012)

Mit Hilfe der Dickschichttechnik lassen sich kostengünstig elektrochemische Sensoren herstellen (Stückpreise ab 2,-€). Dadurch ist es möglich, diese Sensoren als Einweg-Artikel zu verwenden.

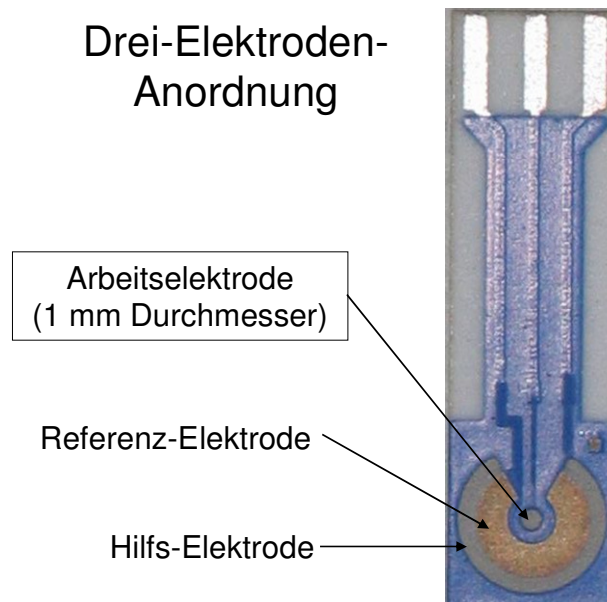


Abbildung 1.1.5 Beispiel für einen Dickschichtsensor (hier von der Firma BVT aus Tschechien)
Am Rand deutlich erkennbar ist die weiße Keramik-Trägerschicht. Ebenfalls erkennbar sind die Leiterbahnen zu den Kontakten, die mit einem blauen Schutzlack überzogen sind.

1.1.3 Biosensoren

1.1.3.1 Definition eines Biosensors

Biosensoren sind Sensoren, bei denen man den Vorteil einer hohen Selektivität von biologischen Komponenten und die einfache Handhabung von elektrochemischen Messgeräten kombiniert. Grundsätzlich besteht ein Biosensor aus zwei Teilen. Zum einen aus einer biologischen Komponente und zum anderen aus einer physikalischen Komponente, die als Signalwandler (Transducer) fungiert. Dabei ist die biologische Komponente auf der physikalischen Komponente immobilisiert (Abb. 1.1.4) [Turner et al., 1987].

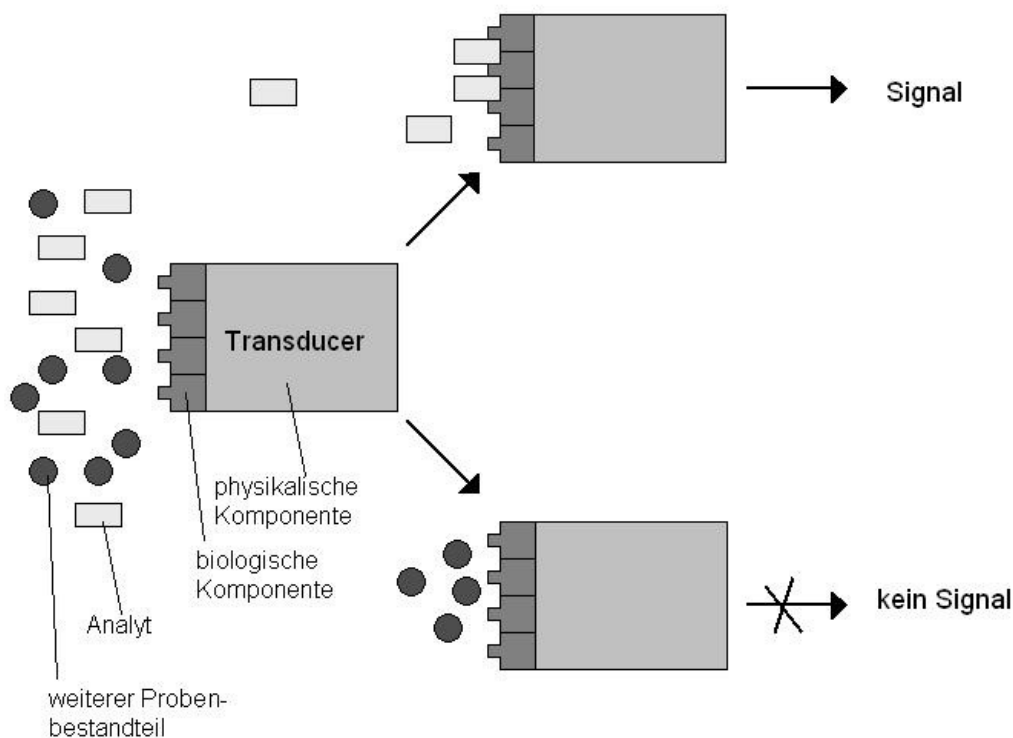


Abbildung 1.1.6 Schematische Darstellung eines Biosensors

Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip liefert nur einer zur biologischen Komponente passender Analyt ein Signal. Die biologische Komponente ist auf dem Transducer immobilisiert (Quelle: Hartmann, 2004).

Zu den oben genannten Eigenschaften, das Vorhandensein einer biologischen und physikalischen Komponente, muss nach IUPAC ein Biosensor zusätzlich regenerierbar und zur kontinuierlichen Messung fähig sein [Thevenot et al., 1999].

Dies führt jedoch zu der Problematik, dass Einmal-Enzymelektroden, wie sie mittlerweile standardmäßig zur Blutzuckerbestimmung eingesetzt werden, nach IUPAC keine Biosensoren sind, da sie weder regeneriert werden, noch zu kontinuierlichen Messungen verwendet

werden. Deshalb wird die Definition von Turner et al. (1987) allgemein akzeptiert [Scheller et al., 2001]. Die Funktionsweise eines Biosensors kann in zwei Teilschritte unterteilt werden. Im ersten Schritt dient die biologische Komponente des Biosensors zur spezifischen Detektion eines Analyten. Im zweiten Teilschritt wandelt die physikalische Komponente die chemische Reaktion in ein elektrisches Signal um. Daraus resultierend kann, abhängig von der Methode, die Analytkonzentration proportional oder indirekt proportional quantifiziert werden. Neben Enzymen und Antikörpern als biologische Komponenten werden auch Lektine oder ganze Zellen eingesetzt. Elektroden, Schwingquarze, Halbleiter oder optische Systeme können die physikalische Komponente sein [Keusgen, 1999]. Ein großes Problem bei der Entwicklung von Biosensoren ist, dass zum einen die biologische Komponente gut auf der Oberfläche der physikalischen Komponente gebunden werden soll, zum anderen aber die Substratspezifität, Funktionalität und Stabilität der Biomoleküle erhalten bleiben muss.

1.1.3.2 Entwicklungen in der Biosensorik

Den ersten Biosensor entwickelte bereits 1956 Prof. Leland C. Clark Jr. [Clark, 1956], als er einen amperometrischen Sensor zur Sauerstoffbestimmung in wässrigen Lösungen erfand. Sechs Jahre später (1962) erarbeitete Clark ein Prinzip, um Elektroden „intelligenter“ zu gestalten. Um einen größeren Analysenbereich abdecken zu können, sollten elektrochemische Sensoren mit einem Enzym kombiniert werden. Dieses Prinzip wurde zum ersten Mal von Clark umgesetzt, indem er eine Sauerstoffelektrode mit dem Enzym Glucoseoxidase kombinierte.

Durch den Sauerstoffverbrauch des Enzyms bei der Glucoseoxidation konnte der Glucosegehalt einer Lösung bestimmt werden. Folglich nannten Clark und Lyons diese Elektrode „Enzymelektrode“ [Clark und Lyons 1962]. 1967 wurde das Prinzip der Enzymelektrode von Updike und Hicks aufgenommen und die notwendigen technischen Details zu Herstellung von Glucose-Enzymelektroden veröffentlicht.

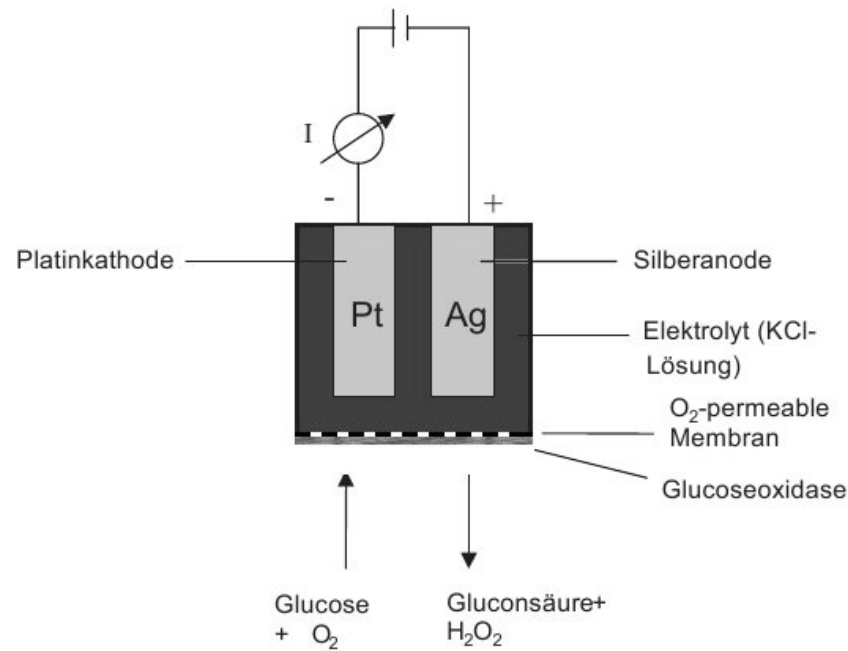


Abbildung 1.1.7 Glucosesensor auf Basis einer Clark-Sauerstoffelektrode
Glucose wird enzymatisch an der Elektrodenoberfläche oxidiert und der Sauerstoffverbrauch mit der Elektrode gemessen.

Bereits 1969 wurde der erste potentiometrische Enzymsensor von Guilbault und Montalvo entwickelt [Guilbault und Montalvo, 1969], mit dem man mit Hilfe des Enzyms Urease auf einer ammoniumselektiven Elektrode Harnstoff durch eine Veränderung des Potentials, resultierend aus der enzymatischen Umsetzung von Harnstoff zu NH₃, detektieren konnte.

Die ersten thermischen Transducer wurden 1974 eingesetzt. Dabei erhielten sie unterschiedliche Namen. Während Cooney die Sensoren als thermische Enzymsonden benannte [Cooney et al., 1974], wurden sie von Mosbach als Thermistoren bezeichnet [Mosbach und Danielsson, 1974].

Die kommerzielle Verwendung eines Biosensors fand bereits im Jahr 1975 statt, als die Firma Yellow Springs Instrument Company aus Ohio einen Glucosesensor verkaufte. Abweichend von Clarks Sauerstoff-Enzymelektrode wurde bei der kommerziellen Nutzung ein amperometrischer Biosensor zur Detektion von Wasserstoffperoxid verwendet. Des Weiteren entwickelten Lubbers und Opitz im Jahr 1975 die ersten faseroptischen Sensoren mit immobilisiertem Indikator [Lubbers und Opitz, 1975], die als Optoden bezeichnet wurden. Die ersten Optoden wurden zur CO₂- oder O₂-Messung verwendet. Erweitert wurden Optoden, indem sie mit einem Enzym kombiniert wurden, z.B. Alkoholoxidase [Voelkl et al., 1980]. Die Enzym-Optoden konnten sich aber nicht durchsetzen, im Gegensatz zu den heute kommerziell erhältlichen Optoden für die *in vivo*-Messung von pH-Wert, O₂- und CO₂-

Partialdrücken. Ebenfalls im Jahr 1975 wurde diskutiert, Bakterien als biologische Komponente, z.B. zur Alkoholbestimmung, zu verwenden [Divis, 1975]. Damit begann die Entwicklung von Applikationen für die Biotechnologie und die Ökologie.

Durch die Weiterentwicklung des elektrochemischen Glucosesensors konnte 1976 erstmals Clemens einen Sensor in eine künstliche Bauspeicheldrüse einfügen [Clemens et al., 1976]. Aus diesem System resultierte später der kommerziell erhältliche Biostator von Miles (Elkhart). Dieser wiederum wurde durch ein Blutzuckermessgerät der Firma VIA Medical (San Diego) ersetzt, welches semikontinuierlich und katheterbasiert arbeitet. Einen neuen Ansatz zur Verwendung eines Biosensors entwickelte die Firma La Roche (Schweiz) ebenfalls 1976 mit ihrem Laktat-Messgerät LA640. Hier wurde Hexacyanoferrat als Mediator zwischen der Laktatdehydrogenase und Elektrode verwendet. Dies war ein wichtiger Schritt für die mediatorbasierten Biosensoren.

Im Jahr 1982 wurde erstmals ein Glucose-Biosensor mit einer nadelförmigen Enzymelektrode zur subkutanen Implantation *in vivo* von Shichiri entwickelt [Shichiri et al., 1982]. Die Veröffentlichung von Liedberg im Jahr 1983 ließ es erstmals zu, Immunosensoren durch Immobilisierung von Antikörpern kommerziell zu nutzen [Liedberg et al., 1983]. Er stellte die Möglichkeit dar, mittels Oberflächenplasmon-Resonanz in Echtzeit Affinitätsreaktionen zu erfassen. Diese Technologie wird kommerziell seit 1990 von dem Unternehmen Biacore (GE Healthcare, England) verwendet.

Zu den optischen Biosensoren gehört zusätzlich zu Oberflächenplasmon-Resonanz-Systemen die Gruppe der Interferenzsensoren. Bei diesen Sensoren erfolgt die Detektion durch die Bestimmung von Änderungen der Interferenz an den Grenzflächen des reflektierten Lichtes. Somit lassen sich an Glasträgern, die mit Biokomponenten immobilisiert sind, ebenfalls Affinitätsreaktionen beobachten. Optische Biosensoren werden sowohl in der routineanalytischen Anwendung (z.B. die Detektion von Nikotin) wie auch zum Wirkstoffscreening in High-Throughput-Systemen verwendet. Des Weiteren können mit optischen Biosensoren Interaktionen zwischen Biomolekülen (z.B. Antigen-Antikörper Reaktion) beobachtet werden.

Aufgrund der hohen Kosten bei der Produktion von Biosensoren blieb der kommerzielle Erfolg aus. Die ersten kostengünstigen Biosensoren entwickelte 1984 Cass, indem er Ferrocen und deren Derivate als Redoxmediatoren bei Oxidoreduktasen einsetzte [Cass et. al., 1984].

Redoxmediatoren oder auch Redoxvermittler sind niedermolekulare Stoffe, die den Transport von Elektronen zwischen dem Redoxzentrum eines Enzyms und der Oberfläche einer Elektrode durchführen.

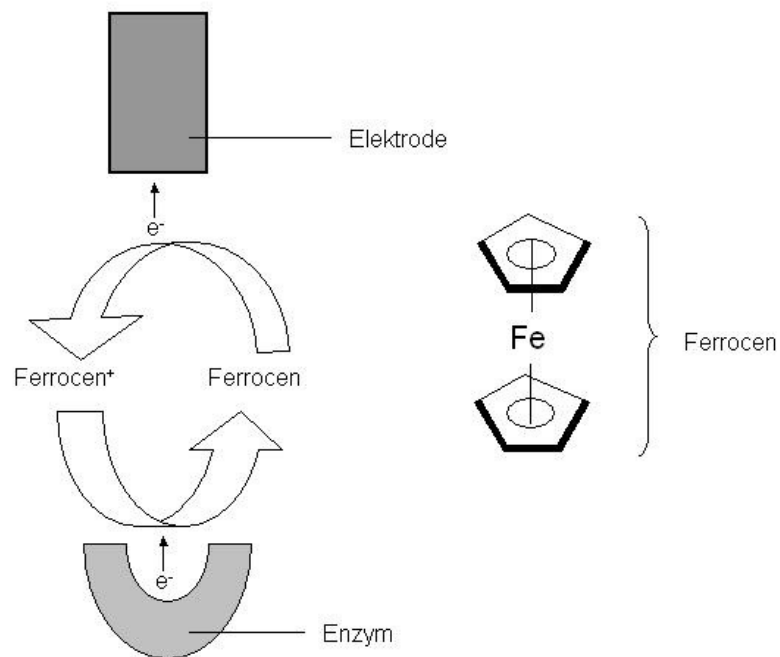


Abbildung 1.1.8 Redoxmediator Ferrocen und die Methode des Elektrodentransports (Quelle: Hartmann, 2004)

Die Verwendung von Antikörpern, Enzymen, intakten Zellen, Nukleinsäuren und Rezeptoren zusammen mit elektrochemischen, optischen, piezoelektrischen oder thermischen Transducern wurde vor allem in den neunziger Jahren diskutiert [Turner, 1991, 1992, 1994, 1995]. Angewendet werden Biosensoren im Bereich der Gesundheitsvorsorge [Alcock und Turner, 1994], im Bereich der Lebensmittelanalytik [Kress-Rogers, 1996], in der Prozesskontrolle [White und Turner, 1994] und beim Umweltmonitoring [Dennison und Turner, 1995]. Eine weitere Nutzung von Biosensoren besteht im militärischen Bereich.

1.1.3.3 Thermische Biosensoren

Thermische Biosensoren können als kleine Mikrokalorimeter angesehen werden, auf denen eine Biokomponente immobilisiert ist. Die Biokomponente ist in eine kleine Säule gepackt, die in der Nähe eines temperaturempfindlichen Transducers, meistens ein Thermistor, lokalisiert ist. Bei der exothermen chemischen Reaktion des Enzyms, z.B. die enzymatische Oxidation von Glucose zu Gluconsäure, wird die entstandene Wärme und damit die resultierende Temperaturerhöhung durch den Thermistor registriert.

1.1.3.4 Piezoelektrische Biosensoren

Der Schwingquarz bei piezoelektrischen Biosensoren arbeitet als Mikrowaage. Der Quarz schwingt, sobald dieser teilweise oder aber auch ganz in Flüssigkeiten eingetaucht wird. Ändert sich nun das Gewicht auf dem Quarz, so verändert dies die Oszillation. Dies wieder kann gemessen werden. Als biologische Komponenten werden Antikörper, Enzyme oder Antigene verwendet. Vorteile eines piezoelektrischen Biosensors sind sein schnelles Ansprechverhalten, die Einfachheit, die stabile Signalausgabe, die geringen Kosten des Lesegerätes und dass keine spezielle Probenbehandlung nötig ist. Der Nachteil besteht in der geringen Sensitivität in flüssigen Applikationen und in den Interferenzen mit nicht spezifischen Bindungen. Verwendung findet der piezoelektrische Biosensor unter anderem bei der Detektion von *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Candida* und weiteren Mikroorganismen und mikrobiellen Toxinen. Des Weiteren wird der Sensor bei der Detektion von Glucose, Atrazin oder Propazin eingesetzt.

1.1.3.5 Optische Biosensoren

Aufgrund ihres Prinzips können optische Biosensoren in drei Gruppen unterteilt werden:

Evaneszentfeldsensoren

Indikatorsensoren

Reflektometrische Interferenzsensoren

1.1.3.5.1 Evaneszentfeldsensoren

Licht, das aus einem optisch dichteren auf ein optisch dünneres Medium trifft, wird an der Grenzfläche reflektiert oder gebrochen. Ist der Einfallswinkel des Lichtes gleich dem Grenzwinkel der Totalreflexion, so wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Ist er größer als der Grenzwinkel, dann erfolgt die Totalreflexion des Lichtstrahls. Kommt es zu einer Totalreflexion an der Grenzfläche, klingt die Lichtintensität hinter der Grenzfläche exponentiell ab. Diesen Bereich jenseits der Phasengrenze bezeichnet man als „evaneszentes Feld“.

Man kann das evaneszente Feld zur Stimulation und Detektion von Prozessen an der Grenzfläche nutzen [Eggins, 1996], so kann man z.B. im Feld Moleküle zur Fluoreszenz anregen. Eine Möglichkeit des Einsatzes von Evaneszentfeldsensoren wäre die Detektion von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, nachdem man einen mit Antikörpern beschichteten Sensor mit dem Analyten reagieren ließ. Zu der Gruppe der Evaneszentfeldsensoren zählen die Oberflächenplasmon-Resonanz, der Gitterkoppler und der Prismenkoppler.

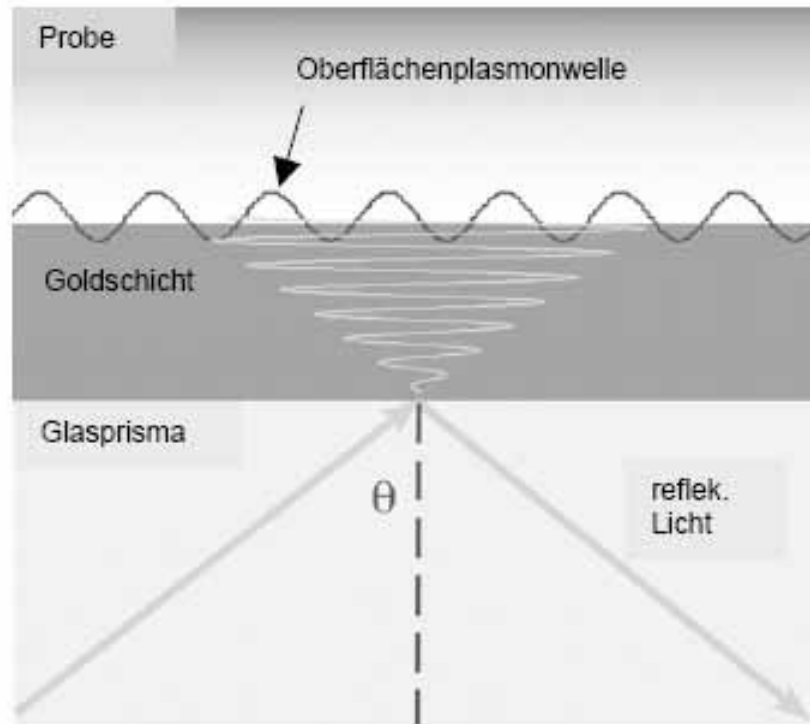


Abbildung 1.1.9 Schematische Darstellung des Prinzips der Oberflächenplasmon-Resonanz
[Hartmann, 2004]

1.1.3.5.2 Indikatorsensoren (Optoden, Optroden)

Ein faseroptisches System, bei dem ein Lichtleiter mit einem Indikatorfarbstoff kombiniert ist, nennt man Indikatorsensor. Kombiniert man einen Indikatorsensor mit einer biologischen Komponente, so erhält man einen Biosensor. Das Prinzip eines Indikatorsensors ist, dass eine Änderung des Indikatorfarbstoffes durch den Analyten erfolgt. Möglich sind ein Farbumschlag oder eine Fluoreszenzlöschung. Dies kann zur Quantifizierung eingesetzt werden. Möglichkeiten für einen Farbumschlag sind z.B. die Veränderung des pH-Wertes oder die Bildung von Komplexen mit den Analyten. Eine Fluoreszenzlöschung kann z.B. durch eine Substitution einer fluoreszenzmarkierten Substanz durch den Analyten erfolgen. Ein Enzym-Indikatorsensor ist z.B. der Penicillinsensor [Hall, 1995]. Dabei sind in der Reaktionskammer des Lichtleiters das Enzym Penicillinase und ein Triphenylmethylnfarbstoff vorhanden. Durch die Umsetzung des Penicillins zur Penicillinsäure und zu einem Proton durch das Enzym ändert sich der pH-Wert, was eine Farbänderung des Indikators zu Folge hat, welche detektiert wird.

1.1.3.5.3 Reflektometrische Interferenzsensoren

Das Prinzip der reflektometrischen Interferenzsensoren ist, dass an Grenzflächen von transparenten Schichten eingestrahktes Licht teilweise reflektiert wird und diese Teilstrahlen miteinander interferieren können. Die daraus entstehenden charakteristischen Interferenzspektren können quantitativ analysiert werden. Wenn Licht auf einen transparenten Träger eingestrahkt wird (z.B. Glas oder Glas mit einer biosensitiven Beschichtung), dann wird der Lichtstrahl entweder transmittiert oder reflektiert. Im einfachsten Fall ist die Grenzfläche der Übergang vom Medium Luft zum Medium Glas. Durch die unterschiedlichen Weglängen der reflektierten Lichtstrahlen resultiert eine Phasenverschiebung. Dadurch kommt es zu destruktiven und konstruktiven Interferenzen und damit zur Entstehung eines charakteristischen Interferenzspektrums. Lagert man nun Biomoleküle an eine biosensitive Beschichtung eines Glasträgers, so erhält man als Ergebnis die Vergrößerung der optischen Dicke. Der Teilstrahl, der an der Grenzfläche des Glases mit der biosensitiven Beschichtung und der Analytlösung reflektiert wird, muss deshalb eine längere Wegstrecke zurücklegen. Dies bewirkt eine Phasenverschiebung und damit eine charakteristische Veränderung des Interferenzspektrums. Diese Änderung, die proportional zur Änderung der optischen Schichtdicke ist, kann zur Auswertung verwendet werden.

1.1.3.6 Elektrochemische Biosensoren

Die elektrochemischen Biosensoren werden weiter in die Gruppen konduktometrische Biosensoren, potentiometrische Biosensoren und amperometrische Biosensoren aufgeteilt. Dabei sind die potentiometrischen und amperometrischen Biosensoren die wichtigsten Gruppen der elektrochemischen Biosensoren.

1.1.3.6.1 Konduktometrischer Biosensor

Das Prinzip der konduktometrischen Biosensoren basiert auf der Änderung der Leitfähigkeit in Lösungen. Dabei ist die biologische Komponente, die sich in einer geeigneten Matrix befinden muss, zwischen zwei Ohmschen Leitern angeordnet. Anwendung findet die Technik bei biospezifischen Reaktionen, bei denen ionische Verbindungen beteiligt sind. So sind für die konduktometrischen Biosensoren mögliche Biokomponenten Amidasen, die durch die Entstehung von ionischen Gruppen den Leitwert verändern. Des Weiteren sind Dehydrogenasen und Decarboxylasen (Protonenmigration), Phosphatasen und Sulfatasen (Größenänderung der ladungstragenden Gruppen) sowie Kinasen (Änderung des Assoziationsgrades in der ionischen Verbindung) als biologische Komponenten für einen konduktometrischen Biosensor geeignet [Hall, 1995].

1.1.3.6.2 Potentiometrischer Biosensor

Als potentiometrische Biosensoren bezeichnet man Biosensoren, die das Potential zwischen zwei Elektroden messen. Eine der Elektroden ist im Allgemeinen eine Referenzelektrode, die andere Elektrode dient als Messelektrode. Um eine Selektivität der Messelektrode zu erhalten, erfolgt eine Beschichtung der Messelektrode mit einer biologischen Komponente. Potentiometrische Sensoren basieren auf der Nernst-Gleichung, in der der Bezug zwischen Potential und der Analytaktivität hergestellt wird.

Formel 4: Nernst-Gleichung

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln a_i$$

E_0 = Standardpotential, R = allgemeine Gaskonstante, F = Faraday-Konstante, T = Temperatur,
 z = Ladungszahl, a_i = berechnete Aktivität der Redox-Partner

Die Basis der potentiometrischen Biosensoren ist der Harnstoffsensor von Guilbault und Montalvo [Guilbault und Montalvo, 1969]. Bei diesem Sensor wird Harnstoff durch das Enzym Urease zu CO_2 und NH_3 abgebaut.

Reaktionsgleichung 2:



Der bei der Reaktion entstandene Ammoniak diffundiert durch eine gaspermeable Membran und bewirkt damit an der pH-sensitiven Elektrode eine Potentialänderung, die proportional zur Ammoniakkonzentration ist.

1.1.3.6.3 Amperometrischer Biosensor

Das Prinzip des amperometrischen Biosensors ist die Messung der Stromstärke bei Redoxprozessen bei einem konstanten Potential an den Elektroden [Bard und Faulkner, 1980]. Dabei besteht die Möglichkeit, entweder ein Zwei-Elektroden-System zu verwenden (mit Arbeits- und Referenzelektrode) oder ein Drei-Elektroden-System (mit Arbeits-, Hilfs- und Referenzelektrode). Der Vorteil des Drei-Elektroden-Systems besteht darin, dass die zu messende Stromstärke nicht über die Referenzelektrode abgeleitet wird, sondern über die Hilfselektrode. Dadurch werden Diffusionspolarisation der Referenzelektrode und stromflussbedingter Spannungsabfall in der Lösung verhindert. Das Biomolekül wird bei einem amperometrischen Biosensor direkt auf die Arbeitselektrode (unabhängig ob Zwei- oder Drei-Elektroden-Anordnung) des amperometrischen Detektors immobilisiert. Daraus ergeben sich ein einfacher Messaufbau und eine kostengünstige Meßmethode. Zwischen der

Stromstärke I und der Geschwindigkeit der Redoxreaktion dn/dt besteht folgender Zusammenhang:

Formel 5

$$I = z \cdot F \cdot dn/dt$$

Z = Ladungszahl, F = Faraday-Konstante

1.1.4 Flow Injection Analysis (FIA)

Die Fließ-Injektions-Analyse ist schon seit längerem eine Möglichkeit, automatisch bzw. halbautomatisch Analysen durchzuführen [Ruzicka und Hansen, 1975]. Allgemein besteht der einfachste Aufbau eines FIA-Systems (siehe Abb. 1.1.10) aus einem Autosampler, einer Peristaltikpumpe, einem Injektionsventil, einer Reaktionsstrecke, einem Detektor und einem Computer zur Datenaufnahme und Steuerung des Analysenablaufs.

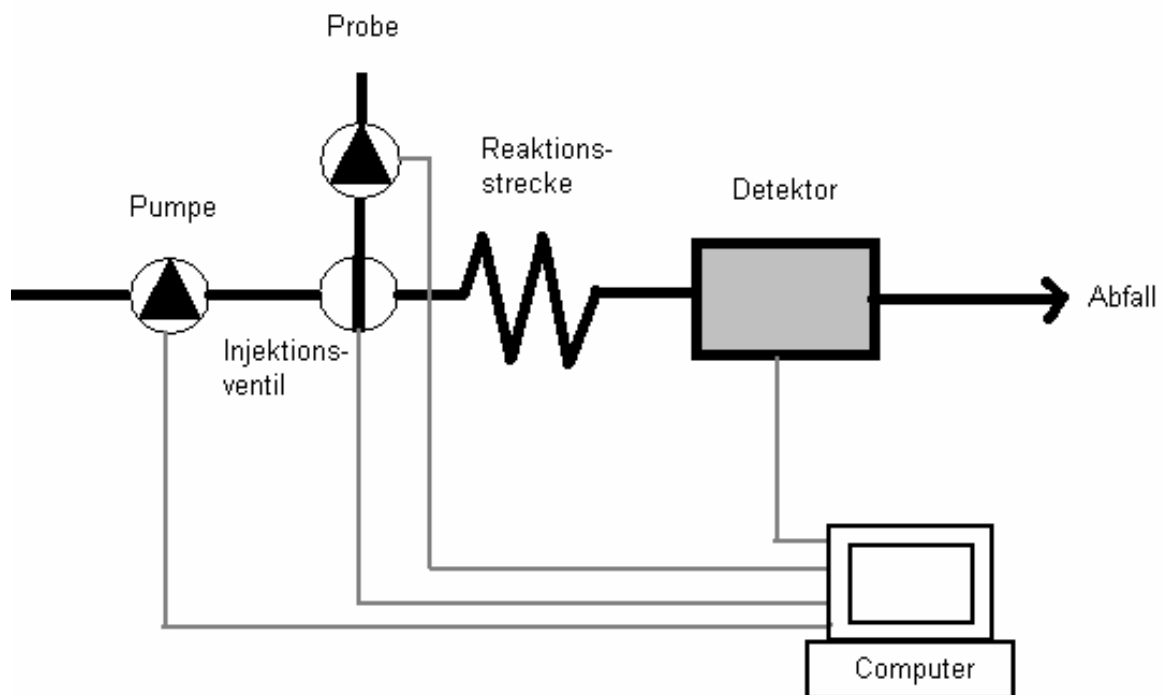


Abbildung 1.1.10 Schematische Darstellung eines FIA-Systems

Darüber hinaus ist im Allgemeinen auch die Verwendung von mehreren Schaltventilen üblich, um dem System Reaktionslösungen zufügen zu können (z.B. ein Fluorophor zum markieren der Probe). Als Detektionseinheit wird am Häufigsten ein photometrischer Detektor verwendet (entweder UV/Vis oder fluorometrisch), man kann aber auch einen Biosensor als Detektionseinheit verwenden [Skoog/Leary, 1996].

1.2 Biologie

1.2.1 Enzyme

Enzyme haben im lebenden Organismus die Aufgabe, ohne selbst umgesetzt zu werden, Stoffwechselreaktionen zu beschleunigen, indem sie die Aktivierungsenergie der Reaktion herabsetzen. Dadurch ist es möglich, Stoffwechselvorgänge unter milden physiologischen Bedingungen 10^8 - 10^{10} -fach schneller ablaufen zu lassen. Enzyme sind meistens globuläre Proteine, die eine relative Molekülmasse zwischen 10.000 und 100.000 Dalton besitzen. Enzyme zeichnen sich durch ihre hohe Substratspezifität aus, das heißt, dass sie nur mit einem ganz bestimmten Substrat reagieren, während selbst Substanzen, die strukturell verwandt sind, nicht umgesetzt werden. Diese Substratspezifität ist jedoch bei verschiedenen Enzymen unterschiedlich stark ausgeprägt. Ausgeprägter als die Substratspezifität ist ihre Stereospezifität, so dass Enzyme im Allgemeinen nur eines von zwei möglichen Isomeren umsetzen. Des Weiteren können Enzyme nur eine von mehreren Reaktionen, die das Substrat eingehen kann, katalysieren.

Die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms ergibt sich aus dem aktiven Zentrum, welches aus Teilen der Polypeptidkette durch eine besondere Faltung entsteht. Das aktive Zentrum eines Enzyms bildet durch Wechselwirkungen mit dem Substrat einen Enzym-Substrat-Komplex. Dies kann nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erfolgen, oder aber das aktive Zentrum passt sich durch eine Konformationsänderung der Substratstruktur an („induced fit“). Der Komplex reagiert dann zu den Produkten ab. Zusätzlich zu dem eigentlichen Proteinanteil können auch noch Cofaktoren für die Funktionsfähigkeit eines Enzyms nötig sein. Sind diese Cofaktoren an das Enzym kovalent gebunden, so nennt man sie prosthetische Gruppe. Im Gegensatz zum Enzym gehen Cofaktoren (auch Koenzyme) verändert aus einer enzymatischen Reaktion hervor. Vor einem erneuten Einsatz müssen sie regeneriert werden.

Man unterscheidet Enzyme in die folgenden verschiedene Gruppen nach Art der katalytischen Reaktionen:

Oxidoreduktasen (Redoxreaktionen)

Transferasen (Übertragung verschiedener Gruppen)

Hydrolasen (hydrolytische Reaktionen)

Lyasen (nicht-hydrolytische Reaktionen)

Isomerasen (Isomerisierungsreaktionen)

Ligasen (Verknüpfungsreaktion)

1.2.1.1 Laccase (EC 1.10.3.2)

Die Laccase gehört zu der Gruppe der Oxidoreduktasen, zu der etwa ein Viertel aller bekannten Enzyme gehören. Oxidoreduktasen katalysieren Reduktionen und Oxidationen. Sie werden eingeteilt in Monooxygenasen, Dioxygenasen, Oxidasen und Dehydrogenasen. Die Laccase ist ein Tetramer, besteht also aus vier Untereinheiten. Diese vier Untereinheiten sind um vier Kupferatome gelagert. Das Enzym ist in Obst und Gemüse, Pilzen, Gewürzen, Tee und Kaffee enthalten. Es ist beispielsweise für die Braunfärbung von geschälten Früchten verantwortlich. Man spricht hierbei von „enzymatischer Bräunung“. Laccasen wandeln Phenole in Chinone um, wobei Sauerstoff verbraucht wird und Wasser entsteht (siehe Abbildung 1.2.1).

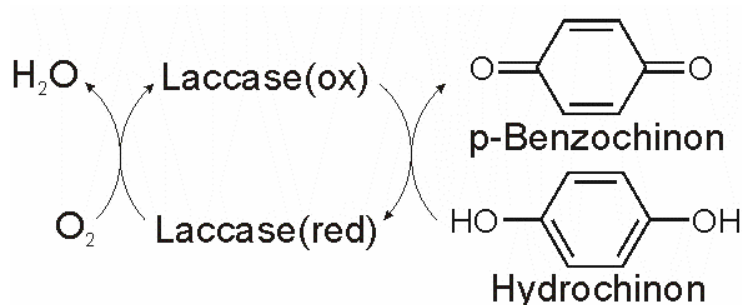


Abbildung 1.2.1 Typische Laccase-Reaktion

Das Substrat Hydrochinon wird in zwei Schritten zu p-Benzochinon oxidiert. Dabei wird das Enzym Laccase von der oxidierten in die reduzierte Form übertragen. Die reduzierte Form der Laccase reduziert Sauerstoff zu Wasser und wird dabei wiederum oxidiert. Das Enzym ist für einen weiteren Durchlauf bereit.

Neben Diphenolen, wie zum Beispiel Hydrochinon, sind in der Literatur noch weitere Substrate aufgeführt, die durch Laccase oxidiert werden. Darunter ist als wichtiger Vertreter das Farbreagenz 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat) (ABTS) zu nennen. Des Weiteren werden in der Literatur unter anderem die Substanzen 1,2,4-Trihydroxybenzol, 2,4-Dichlorphenol, 2,6-Dichlorphenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1-Naphtol, 4-Methylcatechol, 1,2-Dihydroxybenzen, Gujacol, L-DOPA, Pyrogallol, Gallussäure, Ferulasäure oder Kaffeesäure aufgeführt. Das pH-Optimum der Laccasen ist weit gefächert und abhängig von der Herkunft der Laccase. So sind in der Literatur für das pH-Optimum von Laccase pH-Werte von 2 (Laccase aus *Daedalea quercina*) bis zu pH-Werten von 8 (Laccasen aus *Coriolus versicolor* oder *Myrothecium verrucaria*) aufgeführt. Die meisten in der Literatur zu findenden Werte für ein pH-Optimum liegen jedoch in den Bereich von 4,0 bis 5,5 (so zum Beispiel auch für Laccase aus *Trametes versicolor*). Das Temperaturoptimum liegt in einem Bereich von 25°C bis hin zu 55°C [BRENDA, AMENDA und FRENDA, 2008]. In der Literatur werden für verschiedene Laccasen Redoxpotentiale von 430 mV bis hin zu 790 mV aufgeführt [Sadhasivam et al., 2008 / Morozova et al., 2007]. Für amperometrische Biosensoren wurden

auch Potentiale vom -200 mV bis 300 mV untersucht [Haghighi et al., 2003]. Anwendung findet die Laccase in der Getränkeherstellung, beispielsweise zur Entfernung von Phenolen aus dem Most von weißen Weintrauben während der Klärung des Weins, und in Produkten zur Atemerfrischung. Dort reagieren die bei der Oxidation entstehenden Chinone mit Schwefelverbindungen, die in der Mundhöhle für unangenehme Gerüche verantwortlich sind.

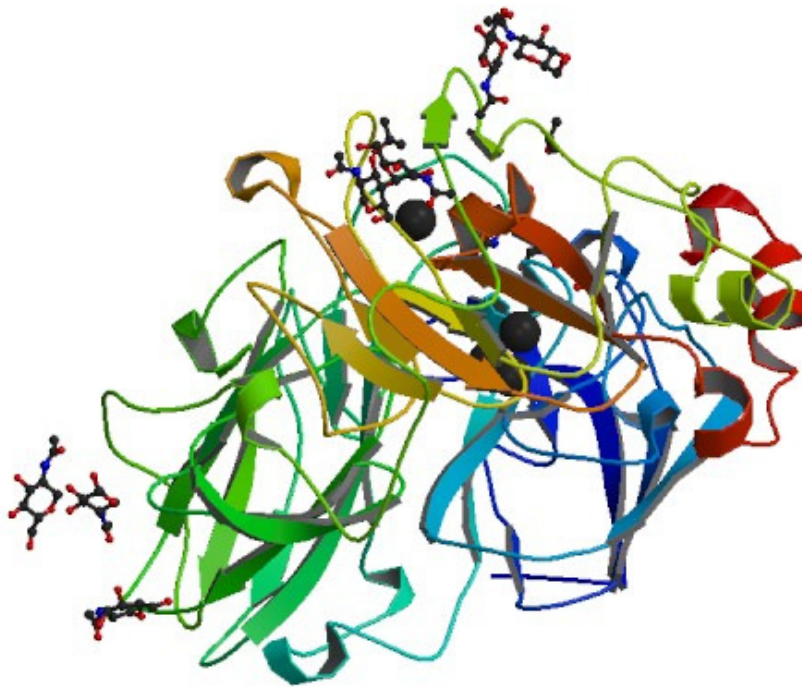


Abbildung 1.2.2 Laccase von *Trametes versicolor*

deutlich erkennbar die vier Kupferatome, wobei drei Atome im Zentrum des Enzyms gelagert sind (Typ 2 (T2) und Typ 3 (T3) Kupfer) und ein weiteres Atom seitlich davon gelagert ist (Typ1 (T1) Kupfer). [Piontek et al., 2002]

Während am T1 Kupfer die Substratoxidation stattfindet und das T1 Kupfer dem Enzym die blaue Farbe verleiht, bilden T2 und T3 Kupfer einen trinuklearen Cluster, an dem die Reduktion von molekularem Sauerstoff und die Freisetzung des Wassers stattfinden [Hajdok, 2012].

1.2.1.2 Glucose-Oxidase (EC 1.1.3.4)

Die Glucose-Oxidase gehört ebenfalls zu der Gruppe der Oxidoreduktasen. Es ist ein Dimer und benötigt Flavin-Adenosin-Dinucleotid als Co-Faktor. Glucose-Oxidase oxidiert das Sauerstoffatom am C1-Kohlenstoffatom der Glucose. Umgesetzt werden Glucose und Sauerstoff zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid. Als natürliche Substanz kommt es in Honig vor, wo das katalysierte Wasserstoffperoxid eine wichtige Rolle zur Haltbarkeit von Honig beiträgt. Ebenfalls wird Glucose-Oxidase bei der Weinherstellung zur Verbesserung der Ausbeute und zur Vermeidung von Essigstich eingesetzt.



Abbildung 1.2.3 Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* [Hecht et al., 1993]

1.2.1.3 Meerrettich-Peroxidase (1.11.1.7)

Meerrettich-Peroxidase (HRP: Horseradish Peroxidase) ist eine Oxidoreduktase und katalysiert die Reaktion eines Elektronendonors und Wasserstoffperoxid zu Wasser und dem Oxidationsprodukt des Donors. Durch die Verwendung von speziellen Substraten ist eine spektroskopische Untersuchung möglich. Als Substrat wird zum Beispiel das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Häufig findet HRP Anwendung bei ELISA-Tests.

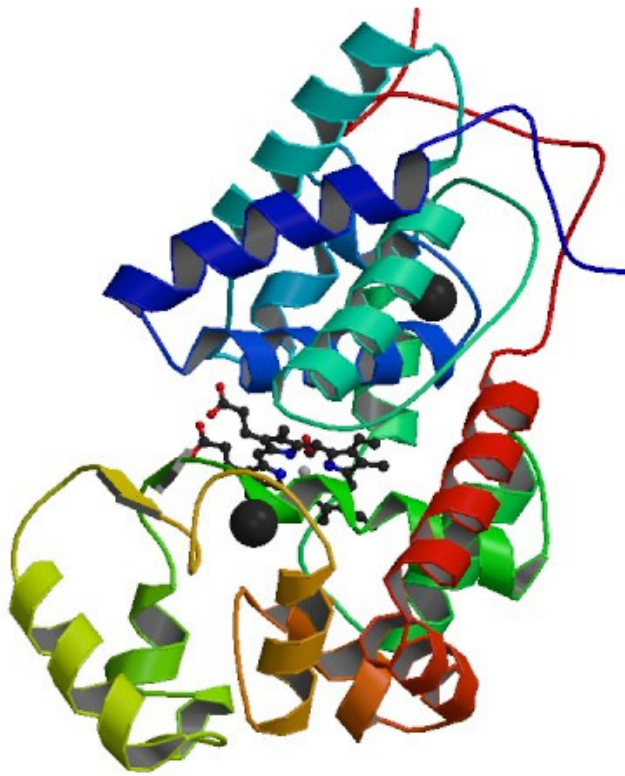


Abbildung 1.2.4

Rekombinante Meerrettich-Peroxidase Isoenzym C mit Ferulasäure

In der Mitte ist die Häm-Gruppe lokalisiert. Unterhalb der Häm-Gruppe befinden sich die Calcium-Atome (schwarzer Punkt). Die Häm-Gruppe ist umschlossen von α -Spiralen und β -Folien [Carlsson et al., 2005]

1.2.2 Immobilisierungstechniken

Zur Immobilisierung von Enzymen auf eine Oberfläche gibt es mehrere Möglichkeiten [Weetall, 1993; Turkova, 1999; Guilbault, 1988; Keusgen, 1999; Milka et al., 2000]. Wichtig ist bei allen Möglichkeiten, dass das immobilisierte Enzym keine signifikante Änderung der Stabilität, Funktionalität und Substratspezifität zeigt. Grundsätzlich kann man zwischen zwei verschiedenen Immobilisierungsstrategien unterscheiden. Zum einen gibt es die Bindung (Trägerbindung oder Quervernetzung) von Enzymen, zum anderen die Einhüllung von Enzymen.

Unter Trägerbindung versteht man die Bindung des Enzyms entweder ionisch/adsorptiv oder kovalent. Eine weitere Bindung ist die Quervernetzung des Enzyms (Cross-Linking bzw. Co-Cross-Linking). Einhüllung bedeutet, dass entweder das Enzym von einer permeablen Membran umgeben ist, oder aber dass das Enzym in einer Matrix eines Polymers eingehüllt ist [Hartmeier, 1986; Bullock 1989].

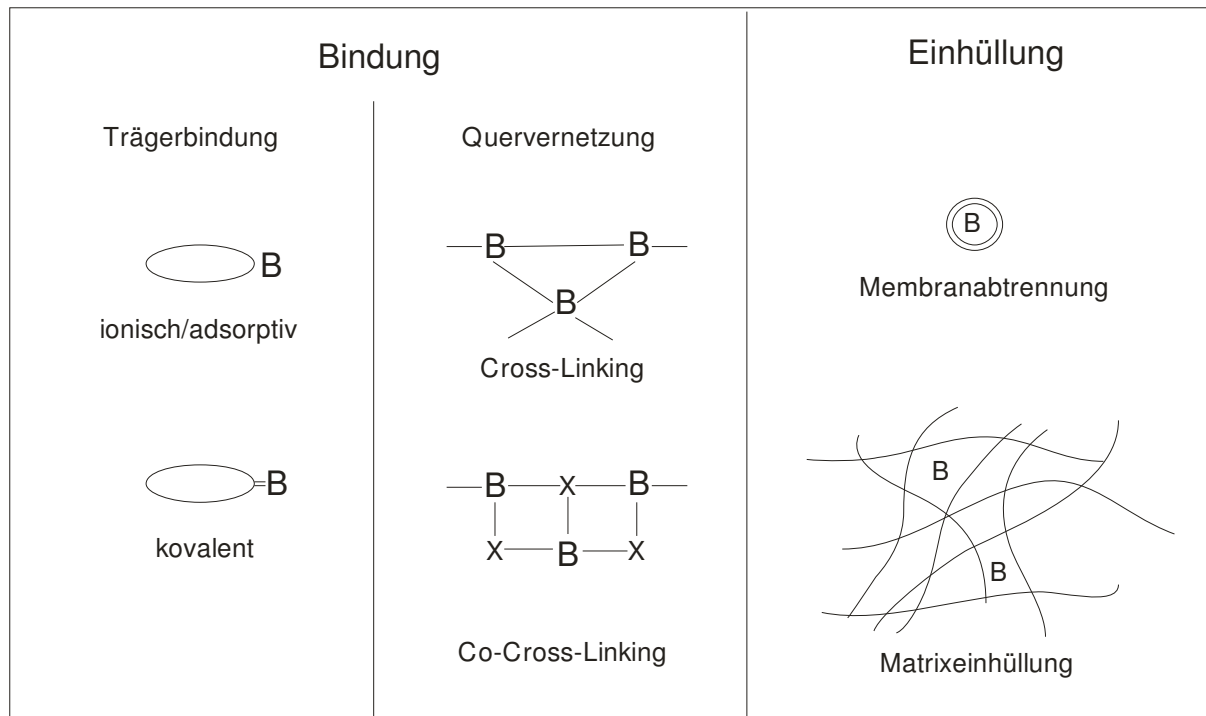


Abbildung 1.2.5 Einteilung der verschiedenen Immobilisierungstechniken für biologische Komponenten (schematische Darstellung: B: Biologische Komponente; X: Inaktives Molekül)

1.2.2.1 Ionische/adsorptive Bindung

Die einfachste Möglichkeit zur Immobilisierung von Enzymen ist die adsorptive Bindung an der Oberfläche, zum Beispiel an einem anorganischen porösen Träger wie Aluminiumoxid. In diesem Fall bleibt die Stabilität, Funktionalität und Substratspezifität fast vollständig erhalten. Jedoch ist in diesem Fall die Bindungsstärke sehr gering. Ebenfalls gering ist die Bindungsstärke bei ionisch gebunden Enzymen.

1.2.2.2 Kovalente Bindung

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung von Enzymen auf Oberflächen bildet die kovalente Bindung, zum Beispiel mit Glutaraldehyd. Glutaraldehyd kann auf eine Oberfläche mit einer Aldehyd-Gruppe immobilisiert werden. Mit der zweiten Aldehyd-Gruppe können dann die terminalen Aminogruppen der Enzyme kovalent gebunden werden. Des Weiteren werden durch die beiden Aldehydgruppen terminale Aminogruppen der Enzyme miteinander vernetzt.

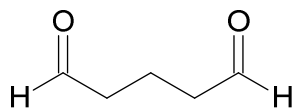


Abbildung 1.2.6 Glutaraldehyd

Dabei kann der Reaktionsmechanismus zur Bindung von Proteinen an Glutaraldehyd unterschiedlich sein: Zum einen kann Glutaraldehyd mit einer Aminosäure zur Schiff'sche Base (IUPAC: Imin) reagieren (siehe Abbildung 1.2.7). Zum anderen wird in der Literatur die Bindung durch eine Michael-Addition diskutiert [Migneault et al., 2004].

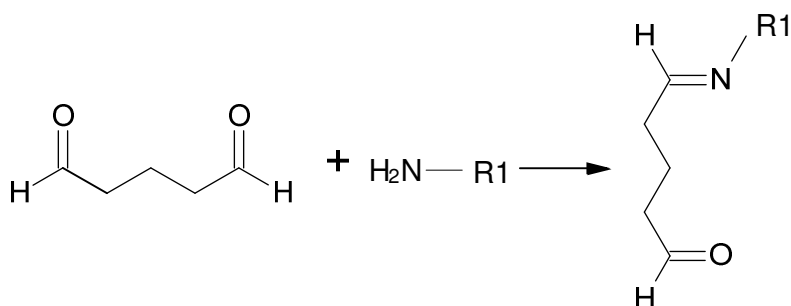


Abbildung 1.2.7 Reaktion von Glutaraldehyd mit einer Aminogruppe zur Schiff'schen Base

1.2.2.2.1 Photolinker

Für diese Arbeit wurden zwei Photolinker zur kovalenten Bindung des Enzyms an die Elektrodenoberfläche verwendet. Photolinker werden unter Lichteinfluss (im Allgemeinen UV-Licht; Wellenlänge < 350 nm) aktiviert und gehen eine kovalente Bindung ein. Dadurch kann ein Substrat auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Es besteht die Möglichkeit des „crosslinking“ und des „co-crosslinking“. Die in dieser Arbeit verwendeten Photolinker sind das Sulfo-HSAB (N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoat) und das FNPA (4-Fluoro-3-nitrophenylazid).

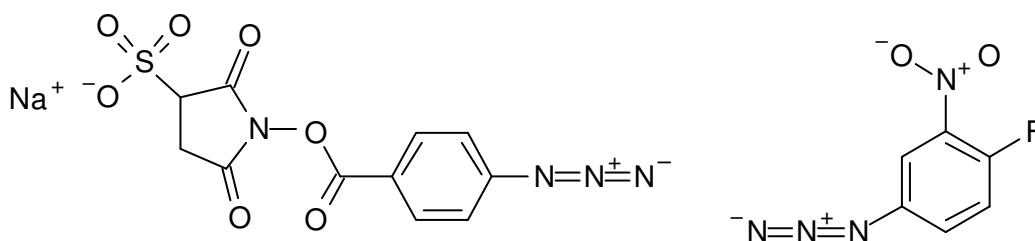


Abbildung 1.2.8

Sulfo-HSAB

FNPA

1.2.2.3 Quervernetzung

Problematisch ist durch die Quervernetzung (Crosslinking) bzw. durch die Bindung auf der Oberfläche (co-crosslinking), die Immobilisierung so zu steuern, dass es beim Enzym zu keinem Abfall der Aktivität kommt.

1.2.2.4 Membranabtrennung

Bei der Membranabtrennung werden Enzyme von einer permeablen Membran umgeben. Diese ist zwar für Puffer, Lösungsmittel und zu untersuchenden Analyten durchlässig, jedoch bleibt das Enzym darin eingeschlossen. Dies ist die aufwendigste Methode zur Immobilisierung von Enzymen, kann jedoch für das Enzym sehr schonend sein.

1.2.2.5 Matrixeinhüllung

Die Matrixeinhüllung ähnelt der Membranabtrennung. Auch diese Methode kann für das Enzym schonend sein, so dass Stabilität, Funktionalität und Substratspezifität fast vollständig erhalten bleiben. Hier wird das Enzym ebenfalls nicht direkt gebunden, sondern von einer Matrix eingehüllt. Verwendet werden künstliche Polymere wie Polyacrylamid und Polystyrol, aber auch natürliche Polymere wie Alginat, Gelatine, Agar-Agar und Carrageenan [Hartmeier 1986; Stein 1996]. Diese Immobilisierungsstrategie ist auch für diese Arbeit verfolgt worden. Eine gewisse Sonderrolle spielt in diesem Zusammenhang die Matrixeinhüllung durch leitende Polymere bei elektrochemischen Biosensoren. Dabei entsteht das Polymer durch das Anlegen einer Spannung direkt auf der Elektroden-Oberfläche. Sind Enzyme in der Polymer-Lösung ebenfalls vorhanden, werden sie in der Nähe der Elektrodenoberfläche in das Polymer mit eingebaut. Wichtig ist bei allen Matrixeinhüllungen, dass darauf geachtet werden muss, dass es noch zu einem Stoffaustausch innerhalb der Matrix kommen kann, um Analyten detektieren zu können.

1.2.2.5.1 Polylactid

Für diese Arbeit wurde als Substrat zur Matrixeinhüllung das Polymer Polylactid gewählt. Polylactid (PLA) ist hochmolekulare Polymilchsäure. Das zugrundeliegende Monomer ist die Milchsäure, die bei bakterieller Fermentation von jeglicher Art von Zucker, z.B. Glucose gebildet wird. Da Milchsäure ein Chiralitätszentrum besitzt, gibt es zwei Arten von Milchsäure, L- und D-Milchsäure (Abbildung 1.2.9). Dies ist bei den

Polymerisationsmethoden zu beachten, da sich drei verschiedene Arten von Polylactiden bilden können: L, L-Lactide, D, L-Lactide und D, D-Lactide.

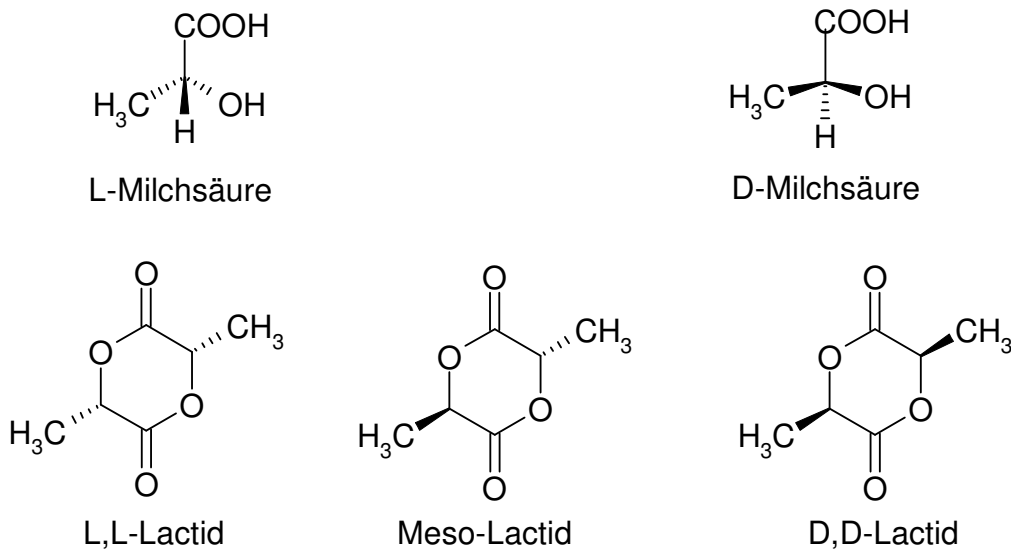


Abbildung 1.2.9 Isomere der Milchsäure und des Lactids

Die Herstellung von PLA kann über zwei verschiedene Wege erfolgen:

Polykondensation:

Die Hydroxylgruppe des einen Monomers reagiert mit der Carbonsäuregruppe des anderen Monomers unter Wasserabspaltung. Vorteil dieser Methode ist, dass hochmolekulare Polymere erhalten werden, die frei von Fremdstoffen sind. Der Nachteil besteht in einer langen Reaktionszeit, Verwendung von hohen Temperaturen und einer ständigen Wasserabfuhr. Daraus resultierend liefert die Polykondensation unbefriedigende Ergebnisse. Abhilfe schafft der Einsatz von Lösungsmitteln. Aufgrund der hohen Verbrauchsmenge dies jedoch relativ teuer und wird deshalb nur vereinzelt in der Medizin eingesetzt, wenn keine Fremdstoffe wie Katalysatoren enthalten sein dürfen. Für die Herstellung von 405 g Polylactid werden 1 kg 90%-ige wässrige Milchsäure, 4,5 kg Acetonitril, 4,5 kg Wasser und 2,3 kg Chloroform benötigt [Ajioka et al., 1995].

Ringöffnungspolymerisation:

Voraussetzung für diese Methode ist das Vorliegen des Milchsäure-Dimers (= Lactid). Als Katalysator für diese Reaktion verwendet man eine Lewis-Säure (Zn(II)-Oktanoat), die nach der Reaktion im Polymer bleibt. Zusätzlich werden Stabilisatoren verwendet, um eine Rückreaktion durch Zn(II)-Oktanoat zu verhindern. Vorteil dieser Polymerisationsvariante ist das Ausbleiben von störenden Kondensationsprodukten, die die Polymerisationsreaktion erschweren. Die mechanischen Eigenschaften von PLA sind abhängig von dem

Molekulargewicht, der stereochemischen Anordnung der Kette sowie dem Grad der Orientierung im kristallinen Material.

Es handelt sich bei Polylactid um einen sogenannten grünen Kunststoff, da er sowohl aus regenerierbaren Stoffen (Pflanzen) hergestellt wird, als auch, im Vergleich zum Beispiel zu Polyvinylchlorid durch natürlich Verrottung vollständig abgebaut wird, ohne dass dabei Schadstoffe freigesetzt werden. Der Abbau erfolgt, indem Wassermoleküle in die Polymilchsäure eindringen und die Esterbindung hydrolytisch gespalten wird. Die daraus resultierenden Moleküle werden von Mikroorganismen zu Wasser und Kohlendioxid zersetzt. Der Abbau hochkristalliner PLA kann Monate bis Jahre dauern.

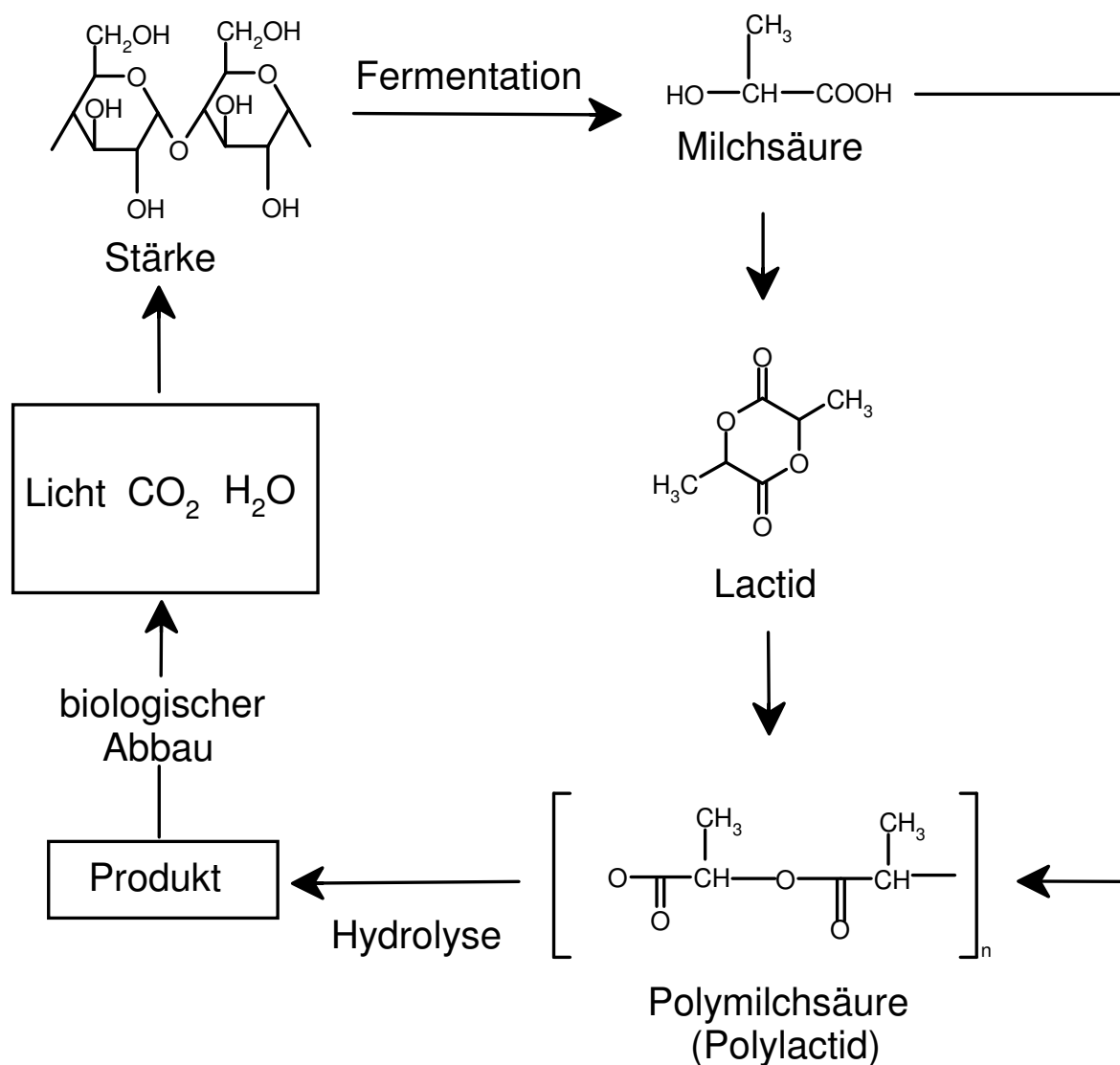


Abbildung 1.2.10 Kreislauf des Polylactids

Beginnend in der linken oberen Ecke mit der Stärke, die zu Milchsäure fermentiert wird. Die Polykondensation erfolgt wie oben beschrieben. Das Polymer wird durch Licht in CO_2 und H_2O abgebaut und steht damit wieder Pflanzen zur Herstellung von Stärke durch Photosynthese zur Verfügung

1.2.2.5.2 Emulgatoren

Unter Emulgatoren versteht man im Allgemeinen einen in einer Flüssigkeit löslichen Stoff, der die gleichmäßige Verteilung von zwei oder mehreren nicht mischbaren Phasen entweder ermöglicht oder erleichtert und die Entmischung verhindert (DIN 53900; Juli 1972). Emulgatoren werden in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Die Einteilung erfolgt über die Ladung des Emulgators. So gibt es die Gruppe der anionaktiven Emulgatoren. Zu dieser Gruppe zählen die Seifen (auch Metallseifen und organische Seifen, wie z.B. Monoethanolaminoleat), sulfurierte Verbindungen wie das Natriumlaurylsulfat und sulfonierte Verbindungen.

Des Weiteren gibt es die Klasse der kationischen Emulgatoren, die meistens aus quartären Ammoniumverbindungen bestehen. Neben den ionischen Emulgatoren gibt es auch nichtionische Emulgatoren, Fettalkohole oder Polyoxyethylenether von Fettsäuren. Allen gemein ist der hohe lipophile Anteil. Die letzte Klasse der Emulgatoren bilden die ampholytischen oder zwitterionischen Emulgatoren, dessen wohl bekanntester Vertreter das natürlich vorkommende Lecithin ist. Diese Klasse wird aufgrund ihrer antistatischen Eigenschaft häufig in Haarwaschmitteln eingesetzt.

In dieser Arbeit sollen Emulgatoren eine gleichmäßige Verteilung der wässrigen Pufferlösung, in der das Enzym gelöst ist, mit dem in Dichlormethan gelösten PLA herstellen. Des Weiteren soll eine Entmischung verhindert werden.

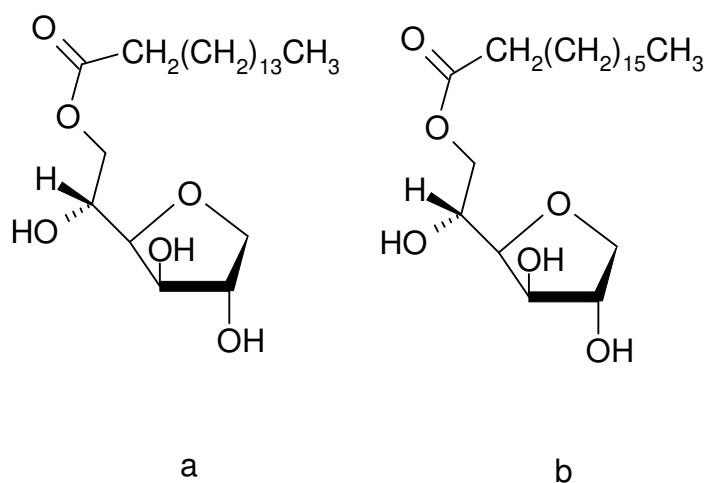
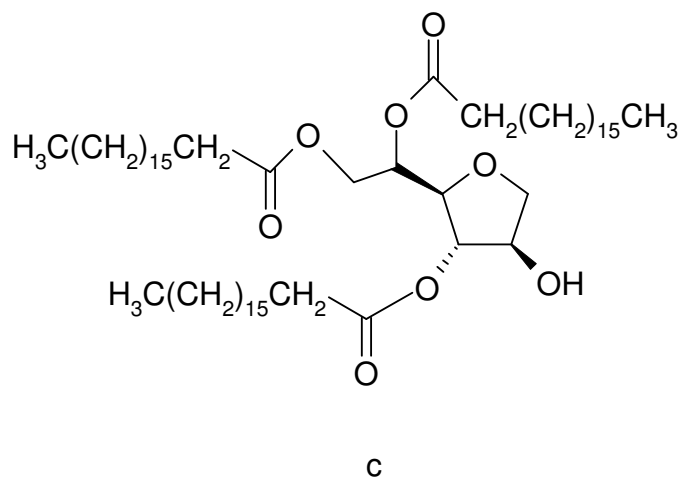


Abbildung 1.2.11

a: Span 40®, auch Sorbitanmonopalmitat
 b: Span 60®, auch Sorbitanmonostearat
 c: Span 65®, Sorbitantristearat
 alle drei Substanzen sind nichtionische Emulgatoren



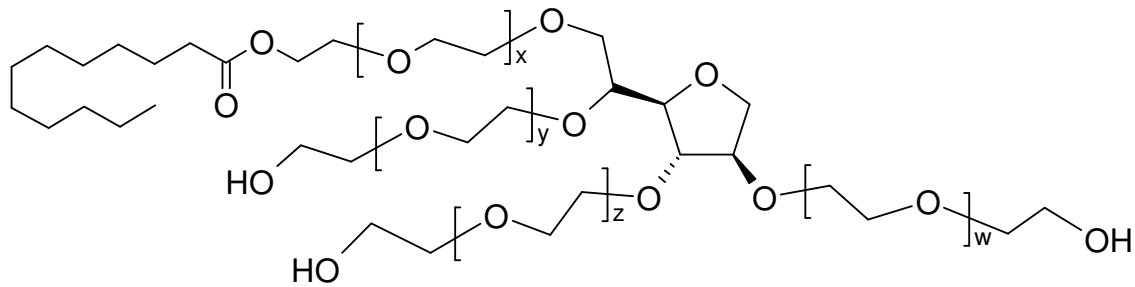


Abbildung 1.2.12 $w+x+y+z=16$, Tween 20[®], auch Polysorbat 20 oder Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat; ein nichtionischer Emulgator

1.2.2.5.3 Carbon Nanotubes

Carbon Nanotubes (CNT) wurden 1991 von dem Japaner Sumio Iijima entdeckt. Sie gehören zu der Familie der Fullerene (reiner Kohlenstoff). Die Kohlenstoff-Röhrchen besitzen einen Durchmesser von einem bis einige 100 Nanometer. Die Verfahren zur Herstellung von Carbon Nanotubes, die derzeit am häufigsten eingesetzt werden, sind Lichtbogenentladung, Laserverdampfung und chemische Gasphasenabscheidung (Chemical-Vapor-Deposition: CVD). Bei der Laserverdampfung wird beispielsweise ein Laserstrahl auf einen Graphitblock gerichtet, der auf circa 3.000 Grad Celsius erhitzt wird. Dieser beginnt zu verdampfen. Der Dampf wird anschließend zu einer wassergekühlten Kupferelektrode transportiert, an der die Nanotubes anlagern. Anschließend werden die Nanotubes in einer Seifenlösung gelöst und zu sogenannten Buckypapers gemacht. Dabei handelt es sich um mehrere ineinander verhakte Nanotubes, die entstehen, wenn man die Seifenlösung von den Nanotubes mit Hilfe eines sehr feinen Filters trennt.

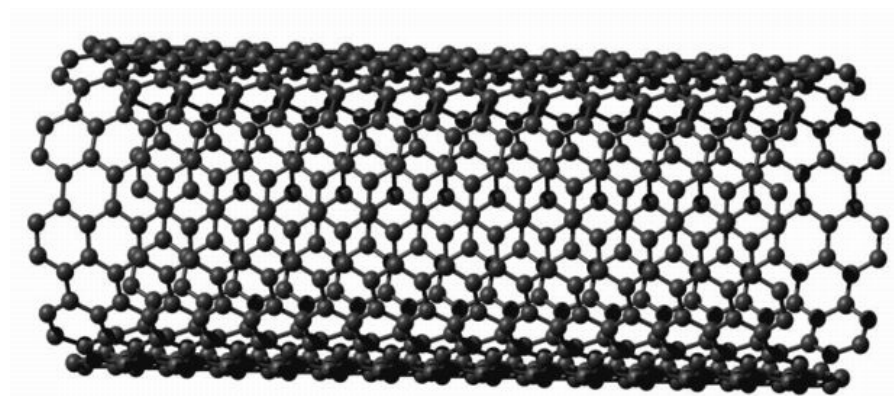


Abbildung 1.2.13 Struktur eines Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNT)

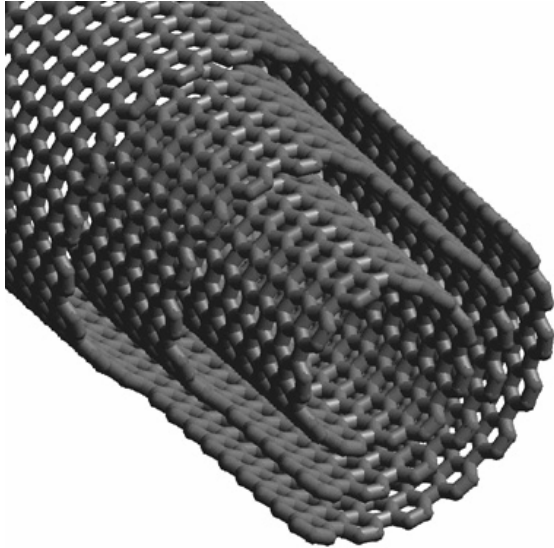


Abbildung 1.2.14

Struktur eines Multi-Walled Carbon Nanotube
Neben dieser Struktur eines MWCNT ("russian doll"-Modell), in dem mehrere einzelne Röhren ineinander verschachtelt sind, gibt es noch die Möglichkeit MWCNT zu erzeugen, indem das Röhrcchen Spiralförmig aufgerollt ist ("parchment"-Modell).

Bei den Carbon Nanotubes unterscheidet man zwischen einwandigen CNT (SWCNT) und mehrwandigen CNT (MWCNT), zwischen offenen oder geschlossenen CNT und zwischen leeren und gefüllten Röhren.

1.3 Analyte

1.3.1 Polyphenole

Polyphenole gehören zu den bioaktiven Substanzen in Pflanzen und kommen dort vor allem als Farb-, Geruchs- oder Geschmacksstoffe vor. Sie stellen die größte Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe dar. Besonders hohe Konzentrationen erreichen Polyphenole in Blättern und äußeren Gewebsschichten der Pflanzen, so z.B. in Äpfeln, Karotten oder Sellerie. Die Grundstruktur der Polyphenole lässt sich vom klassischen Phenol, dem Monohydroxybenzol, ableiten.

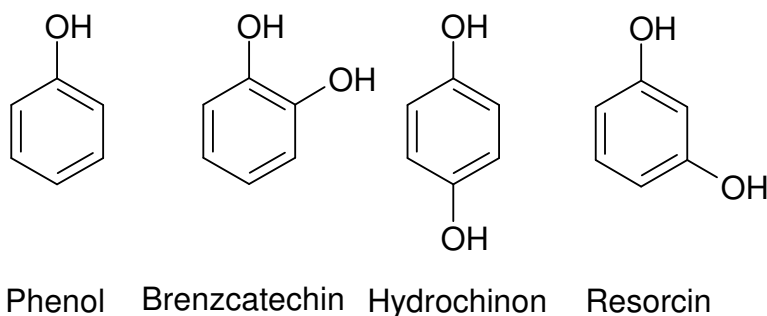


Abbildung 1.3.1 Phenol und Dihydroxybenzenderivate mit Trivialnamen

Polyphenole werden in zwei große Hauptgruppen unterteilt, in Flavonoide und in Phenolcarbonsäuren, wobei diese beiden Hauptgruppen ihrerseits wieder in weitere Gruppen unterteilt werden.

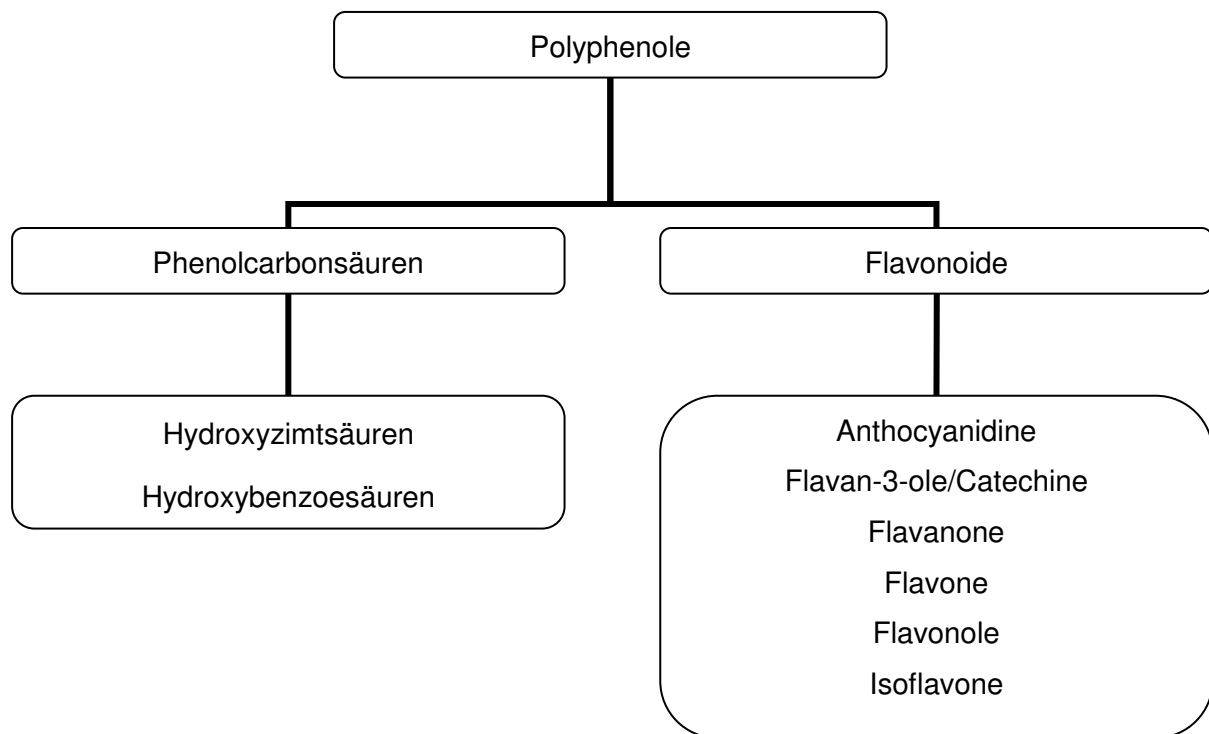


Abbildung 1.3.2 Unterteilung der Polyphenole in zwei Hauptgruppen und deren Untergruppen

1.3.1.1 Flavonoide

Flavonoide sind innerhalb der Polyphenole die größte Gruppe, die in Lebensmitteln vorkommt. In den Pflanzen kommen sie zumeist nativ nicht frei, sondern an Glykoside gebunden vor und sind dadurch wasserlöslich. Bei Flavonoiden handelt es sich vor allem um Farb- sowie Gerbstoffe. Heute sind etwa 4000 Flavonoide bekannt. Aufgrund struktureller Unterschiede kann man sie weiter unterteilen in Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavone (siehe Abb. 1.3.3).

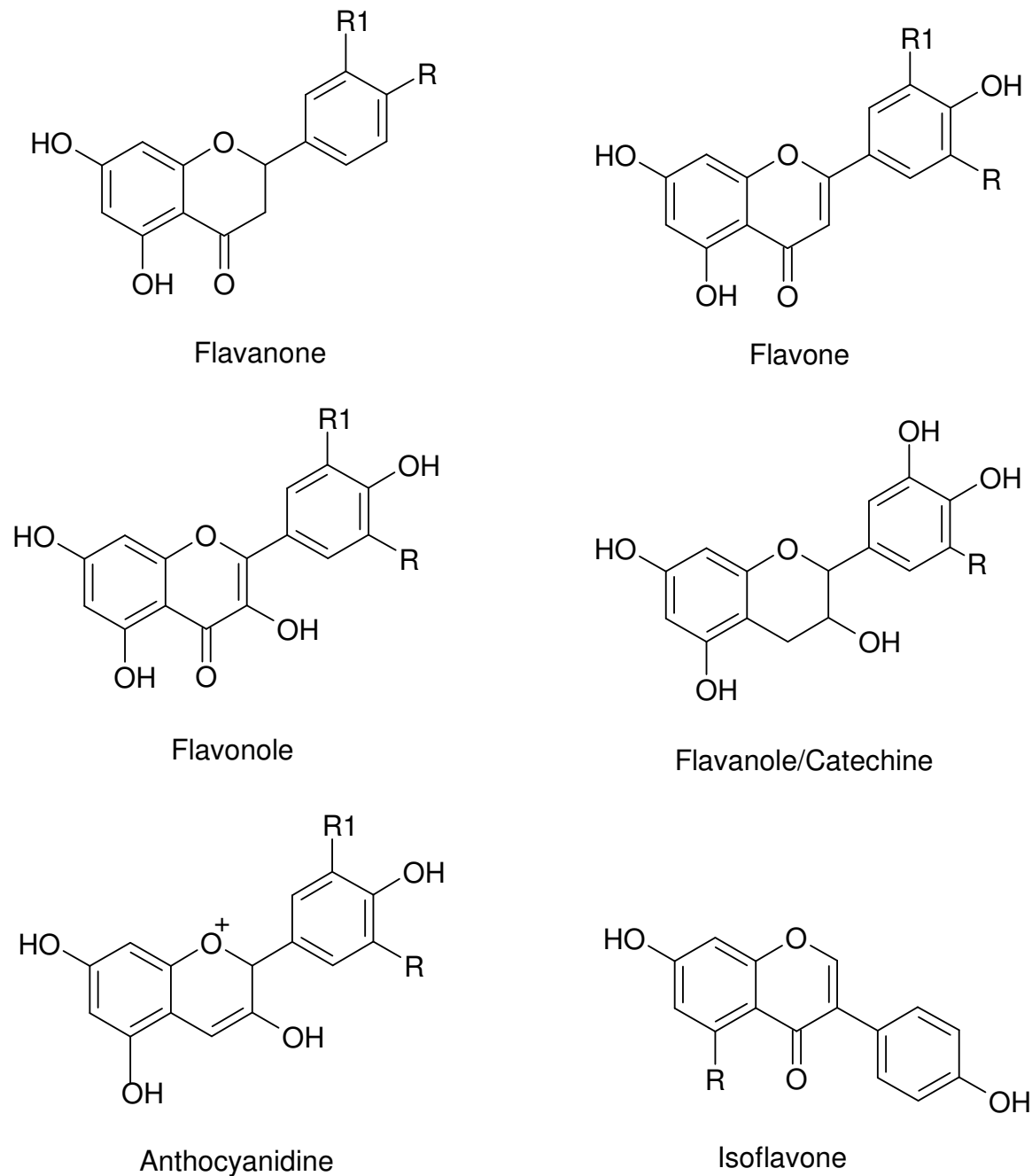


Abbildung 1.3.3 Darstellung der unterschiedlichen Flavonoide; R=Rest, R1=Rest (abhängig von der Substanz könne die Reste –H, –OH oder –OCH₃ sein) [nach Baltes, „Lebensmittelchemie“]

1.3.1.2 Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren werden in Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren unterteilt (Abb. 1.3.4). In Pflanzen kommen sie meist als Gerbsäuren vor und sind somit für den herben Geschmack verantwortlich, z.B. beim schwarzen Tee. Die am häufigsten vorkommenden Hydroxyzimtsäuren sind p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure. Zu den in Früchten am weitesten verbreiteten Hydroxyzimtsäure-Verbindungen gehört die Chlorogensäure, ein Ester aus Kaffeesäure und L-Chinasäure.

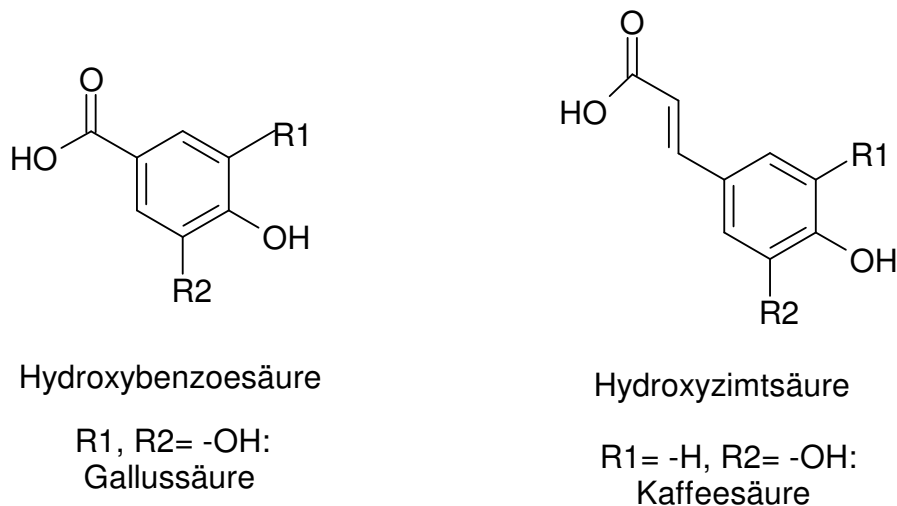


Abbildung 1.3.4 Darstellung von Hydroxybenzoesäure und Hydroxyzimtsäure

1.3.1.3 *Pharmakologische Wirkung der Polyphenole*

Polyphenole besitzen eine gesundheitsfördernde Wirkung. In mehreren Untersuchungen konnte belegt werden, dass Polyphenole antimutagen und tumorprophylaktisch wirken. Dies steht im Zusammenhang mit Einschränkungen im Eikosanoid- und Arachidonsäurestoffwechsel und der Hemmung der Entstehung, Förderung und Weiterentwicklung von Krebszellen. Durch den Eingriff in den Eikosanoid- und Arachidonsäurestoffwechsel leitet sich zudem auch eine antiallergene Wirkung ab.

Aufgrund der antioxidativen Eigenschaften wird bei den Polyphenolen über herz- und gefäßschützende Wirkungen diskutiert. So sollen sie in der Lage sein Thrombosen zu verhindern. Durch das Abfangen von Radikalen wird anscheinend die Thrombozytenaggregation gehemmt, was in einer Konzentrationssenkung an Fibrinogen resultiert. Dadurch verbessern sich wiederum die Fließeigenschaften des Blutes. Die Gefahr der Entstehung von Thrombosen sinkt somit möglicherweise.

Zum anderen könnten sich die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole im Cholesterin-Haushalt bemerkbar machen. Die Konzentration des ungünstigen LDL-Cholesterins wird gesenkt, während gleichzeitig das HDL-Cholesterin erhöht wird. Dies verhindert die Entstehung von Arteriosklerose. Dies alles ist jedoch noch nicht in klinischen Studien bewiesen worden. Des Weiteren scheinen Polyphenole Entzündungen zu verhindern oder schneller abklingen zu lassen. [Baltes, 2000]

1.3.2 Realproben

Um Substanzen unter realen Bedingungen analysieren zu können, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen besteht die Möglichkeit unter Laborbedingungen eine standardisierte Zusammensetzung herzustellen, die einer Zusammensetzung aus der Natur ähnlich ist. Als Beispiel hierfür sei eine Zusammensetzung aus Wasser, Zuckern und Polyphenolen erwähnt, die einen Saft ersetzen soll. Der Vorteil hierbei ist die Verwendung von immer gleichen Substanzgemischen, die unter Laborbedingungen hergestellt und verwendet werden können. Der Nachteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass man niemals die Komplexität von natürlichen Zusammensetzungen erreicht. Die andere Möglichkeit ist die Verwendung von natürlichen Zusammensetzungen, zum Beispiel Säften oder wässrige Auszüge aus Tee. Diese stellen die bessere Alternative dar. Im Gegensatz zu den unter Laborbedingungen hergestellten standardisierten Zusammensetzungen ist jedoch hier zu beachten, dass nur Zusammensetzungen miteinander verglichen werden können, die aus der selben Herstellungscharge (bei Proben, die einem Herstellungsprozess unterzogen worden sind) oder aus dem selben Pflanzenmaterial hergestellt worden sind, da ansonsten die natürliche analytische Schwankungen innerhalb der verschiedenen Proben für eine Vergleichsuntersuchung zu groß sind.

1.3.2.1 Fruchtsäfte

Als Realproben wurden Fruchtsäfte von Aronia und Cranberry eingesetzt. Die Auswahl entfiel auf diese beiden Fruchtsäfte, da sie weit verbreitet sind und der Gehalt an Polyphenolen im Vergleich zu anderen Fruchtsäften, z.B. Apfel- oder Orangensaft deutlich höher ist.

1.3.2.1.1 Aronia (Apfelbeere)

Die Apfelbeere gehört zu der Familie der Rosengewächsen (Rosaceae). Die am häufigsten in der Literatur genannten Arten sind die Schwarze Eberesche (*Aronia melanocarpa*, weitere Synonyme: *Aronia nigra*, *Sorbus melanocarpa* oder *Pyrus melanocarpa*) und die Kahle Apfelbeere (*Aronia arbutifolia*) [Friedrich, Schuricht, 1985]. Die Gattung *Aronia* stammt ursprünglich aus dem Osten Nordamerikas. Sie wächst auf sauren, feuchten Böden von Kanada bis Florida in Gebieten mit einer jährlichen Niederschlagsmenge von 1000 - 1200 mm.

Die Apfelbeere zeichnet sich durch ihren besonders hohen Gehalt an Anthocyanen aus. Das macht sie für die Lebensmittelindustrie zur Gewinnung von natürlichem Farbstoff interessant. Der Gesamtgehalt an Polyphenolen beträgt 740 mg/100 g Frische-Substanz. Aufgrund des

hohen Gehalts an Vitaminen und Mineralien ist sie auch für eine gesunde Ernährung interessant [Albrecht, 1996]. So sollen z.B. 100 g von diesen Früchten ausreichen, um allein den mittleren Bedarf an Folsäure abzudecken [Albrecht et. al. 1993].

Tabelle 2 Inhaltsstoffe von *Aronia* nach Tanaka und Tanaka 2001. Die in den Tabellen angegebenen Werte können von den tatsächlichen Gehalten zum Teil erheblich abweichen. Abhängig von der Sorte, dem Erntezeitpunkt und den anbaulichen Faktoren, wie dem Standort, können die Werte variieren. Sie stellen nur Mittelwerte dar.

	Gehalt in Früchten [mg/100g Frische-Substanz]
Fettlösliche Vitamine	
Provitamin A (Carotin)	0,77
Vitamin E (Tocopherol)	1,42
Vitamin K (Phyllochinon und Menachinon)	0,024
Wasserlösliche Vitamine	
Vitamin B1 (Thiamin)	0,018
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,020
Vitamin B6 (Pyridoxin)	0,028
Vitamin B9 (Folsäure)	0,003
Vitamin C (Ascorbinsäure)	13,7
Niacin	0,30
Pantothensäure	0,28
Mineralstoffe	
Kalium (K)	218
Calcium (Ca)	32,2
Magnesium (Mg)	16,2
Natrium (Na)	2,6
Eisen (Fe)	0,93

1.3.2.1.2 Cranberry (großfrüchtige Moosbeere)

Die großfrüchtige Moosbeere (auch Kraanbeere oder Kranbeere; *Vaccinium macrocarpon*) gehört zu der Gattung der Heidelbeeren (*Vaccinium*), die wiederum zur Familie der Heidekrautgewächse (Ericaceae) gehört [Franke, 1997]. Die Cranberry ist in Nordamerika heimisch und wird seit 1810 in Massachusetts bzw. seit Ende des 19. Jahrhunderts in den nordwestlichen Staaten der USA angebaut. Der Anbau erfolgt mittels Stecklingen, die in großen Becken mit wechselndem Wasserstand gepflanzt werden. Die Ernte erfolgt maschinell

im September. Bei hohem Wasserstand werden die fleischigen, außen roten Beeren abgeschlagen. Die Beeren schwimmen auf der Wasseroberfläche und werden abgesammelt [Franke, 1997].

Tabelle 3 Inhaltsstoffe von *Vaccinium macrocarpon* nach USDA Nutrient Database. Die in den Tabellen angegebenen Werte können von den tatsächlichen Gehalten zum Teil erheblich abweichen. Abhängig von der Sorte, dem Erntezeitpunkt und den anbaulichen Faktoren, wie dem Standort, können die Werte variieren. Sie stellen nur Mittelwerte dar.

	Gehalt in Früchten [mg/100g Frische-Substanz]
Wasserlösliche Vitamine	
Vitamin B1 (Thiamin)	0,012
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,02
Vitamin B6 (Pyridoxin)	0,06
Vitamin C (Ascorbinsäure)	13,3
Niacin	0,10
Pantothensäure	0,30
Mineralstoffe	
Kalium (K)	85
Calcium (Ca)	8
Magnesium (Mg)	6
Natrium (Na)	2
Eisen (Fe)	0,25
Zink (Zn)	0,10
Phosphor (P)	13

1.3.2.1.3 Polyphenole in Aronia und Cranberry

Neben den hohen Vitamin-C-Gehalten weisen sowohl Aronia als auch Cranberry einen hohen Polyphenolgehalt auf, wobei die hier verglichene Wildfrucht Aronia um den Faktor acht höhere Gehalte an Polyphenolen aufweist als die Früchte der kultivierten Cranberry-Sorte Ben Lear. [Zheng und Wang, 2003] (siehe auch Tabelle 4).

Tabelle 4 Vergleich des Gehaltes an Anthocyaninen (^aausgedrückt als Milligramm Cyanidin-3-glucosid Äquivalent / Gramm Frischgewicht) und dem Gesamtphenolgehalt (^bausgedrückt als Milligramm Gallussäure Äquivalente / Gramm Frischgewicht) [nach Zheng und Wang, 2003]

Gattung	Anthocyanine ^a [mg/g]	Gesamtphenolgehalt ^b [mg/g]
Cranberry (Sorte: Ben Lear)	0,32	3,15
Aronia (Wildfrucht)	4,28	25,56

Tabelle 5 Vergleich der verschiedenen Gehalte an phenolischen Verbindungen in Cranberry und Aronia; Myricetin-3-arabinosid ausgedrückt als µg Myricetin-Äquivalente/g Frischgewicht; Quercitin-Aglykons ausgedrückt µg Quercitin-Äquivalente/g Frischgewicht; Kaemferol-Aglykons ausgedrückt als µg Kaempferol-Äquivalente/g Frischgewicht; Anthocyanidin ausgedrückt als µg Cyanidin-3-glucosid-Äquivalente/g Frischgewicht [nach Zheng und Wang, 2003]; ¹) Anteil an Gesamtgehalt Polyphenole

Substanz	Cranberry (Sorte: Ben Lear)		Aronia (Wildfrucht)	
	Konzentration [µg/g]	Anteil ¹ [%]	Konzentration [µg/g]	Anteil ¹ [%]
Vanillinsäure	493,3 ± 2,8	6,3	-	-
Kaffeesäurederivate	-	-	1206,1 ± 12,4	19,0
Kaffeesäure	42,5 ± 1,7	5,4	1411,4 ± 14,3	22,2
Myricetin-3-arabinosid	37,5 ± 3,1	4,8	-	-
Quercetin-3-galactosid	70,4 ± 2,5	9,0	302,4 ± 6,4	4,7
Quercetin-3-glucosid	-	-	273,1 ± 5,7	4,2
Quercetin-3-arabinosid	34,4 ± 3,5	4,4	-	-
Quercetin-3-rhamnosid	41,6 ± 3,5	5,3	-	-
Kaemferol-3-glucosid	5,6 ± 0,6	0,7	-	-
Kaemferol Derivate	4,0 ± 0,5	0,5	-	-
Cyanidin-3-arabinosid	48,0 ± 4,3	6,1	1424,3 ± 18,2	22,4
Cyanidin-3-galactosid	88,9 ± 5,2	11,4	1256,3 ± 11,5	19,8
Cyanidin-3-glucosid	7,4 ± 0,5	0,9	16,9 ± 2,5	0,3
Cyanidin-3-xylosid	-	-	469,0 ± 8,6	7,4
Peonidin-3-galactosid	213,6 ± 9,8	27,3	-	-
Peonidin-3-glucosid	40,4 ± 2,8	5,2	-	-
Peonidin-3-Arabinosid	99,7 ± 7,3	12,7	-	-

Aronia und Cranberry enthalten Polyphenole aus der Gruppe der Phenolsäuren, der Flavonole und der Anthocyanidine. Die Flavonole und Anthocyanidine liegen in den Früchten als Glykoside vor [Zheng und Wang 2003]. Eine ausführliche Darstellung der verschiedenen enthaltenen Polyphenole in den beiden Früchten ist in Tabelle 5 dargestellt.

Während der Polyphenolgehalt in Aronia sich aus vier den Substanzgruppen Kaffesäure- und deren Derivate, Quercitin-Glykoside und Cyanidin-Glykoside, zusammensetzt, enthalten Cranberries zusätzlich Vanillinsäure, Kaemferol-Glykoside und Peonidin-Glykoside vor.

1.3.2.2 Tee

In den „Leitsätzen für Tee, teeähnlich Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen“ des deutschen Lebensmittelbuches ist der Begriff Tee folgendermaßen bestimmt: „stammt ausschließlich aus Blättern, Blattknospen und zarten Stielen des Teestrauches *Camellia sinensis* L.O. Kuntze aus der Familie der Teegewächse (Theaceen), die nach den üblichen Verfahren bearbeitet sind.“ Alle anderen Erzeugnisse, wie z.B. der zurzeit beliebte Roiboos-Tee, fallen unter den Begriff der teeähnlichen Erzeugnisse. Die Tatsache, dass im deutschen Lebensmittelbuch dem Tee Leitsätze gewidmet sind, lässt die Bedeutung dieses Produktes auch in Deutschland erkennen. So wurden im Jahre 2008 alleine in Deutschland 44.266 t Tee importiert [Deutscher Teeverband, 2010]. Die gesundheitsfördernden Effekte des Tees werden in erster Linie den Polyphenolen zugeordnet.

1.3.2.2.1 Die Teepflanze

Die Teepflanze (*Thea sinensis* syn. *Camellia sinensis*) gehört zu der Familie der Theaceae. Der Teestrauch wird als *var. sinensis* (kleine Blätter) und als *var. assamica* (große Blätter) kultiviert. Während die Pflanze wildwachsend eine Höhe von bis zu neun Metern erreicht, wird die Pflanze auf Plantagen durch ständiges Beschneiden auf einer Höhe von ein bis eineinhalb Meter gehalten [Belitz, Grosch, 1992]. Die Pflanzen gedeihen bei mildem Klima mit Temperaturen zwischen 18-28°C und Niederschlagsmengen von ca. 2000 mm. Die besten Produkte werden in Höhenlagen von 500 m- 2000 m gewonnen. Die Pflanzung erfolgt im Allgemeinen durch Stecklinge, aber sie kann auch durch Sämlinge erfolgen. Nach vier bis fünf Jahren erfolgt die erste Vollernte [Franke, 1997].

1.3.2.2.2 Herstellung von Tee

Man unterscheidet bei der Herstellung von Tee drei verschiedene Arten: Der unfermentierte Grüntee, der halbfermentierte Oolong-Tee und der fermentierte Schwarztee. Der Unterschied liegt einzig in der Fermentation. Grüner Tee wird nicht fermentiert, sondern nur gedämpft. Dabei werden die Enzyme in den Teeblättern inaktiviert. Danach werden die Teeblätter gerollt und getrocknet. Bei der Herstellung des Oolong-Tees lässt man die Teeblätter welken und rollt sie danach. Anschließend beginnt die Fermentation, die durch Rösten gestoppt wird.

Daraufhin werden die Teeblätter getrocknet. Wie bei Oolong-Tee lässt man bei der Herstellung vom schwarzen Tee die Blätter welken und rollt sie dann. Es folgt die Fermentation, bei der die Teeblätter bei 35-40 °C fünf bis sieben Zentimeter hoch aufgeschichtet werden [Schlesier, 2002]. Der Fermentationsprozess ist beendet, wenn die Blätter die Farbe einer angelaufenen Kupfermünze aufweisen und einen Geruch abgeben, der an saure Äpfel erinnert. Es erfolgt das Rösten und Trocknen der Teeblätter [Belitz, Grosch, 1992]. Eine Sonderform zur Herstellung von schwarzen Tee ist das CTC-Verfahren (crushing, tearing, curling = zerquetschen, zerreißen, rollen), dass vor allem in Assam durchgeführt wird. Dabei werden die Rollzeit und die Fermentationsdauer wesentlich verringert [Belitz, Grosch, 1992]. Dadurch wird die Verarbeitung billiger und schneller, während das Ergebnis ein gleichmäßig geschnittenes Teeblatt aufweist [Graham, 1992; Bokuchava und Skobeleva, 1969].

1.3.2.2.3 Polyphenole in Tee

In frischen und jungen Teeblättern sind 25 - 30 % der Trockenmasse phenolischen Verbindungen, von denen wiederum 80 % Flavanole sind. Auf die restlichen 20 % verteilen sich Polyphenole der Gruppe der Proanthocyanidine, phenolische Säuren, Flavonole und Flavone. Als Folgeprodukt der enzymatischen Oxidation der Flavanole bei Schwarztee entstehen die Theaflavine und Thearubigene [Belitz, Grosch, 1992]. Die häufig in grünen Tee vorkommenden Flavanole sind (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechingallat, (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechingallat [Schlesier, 2002]. In Tabelle 6 ist die Zusammensetzung von frischen Teeblättern bzw. Aufgüssen von verschiedenen Teesorten aufgeführt.

Tabelle 6 Inhaltsstoffe von frischen Teeblättern und von Teeaufgüssen des grünen, des Oolong- und des schwarzen Tees; Angaben in % der Trockenmasse; für die freien Felder sind keine Daten bekannt

	Frische Blätter [%Tr.]	Grüner Tee, Aufguss [%Tr.]	Oolong-Tee, Aufguss [%Tr.]	Schwarzer Tee, Aufguss [%Tr.]
Koffein	4	3-6	2,3 - 2,8	3 - 6
Catechine	30	30 - 42	1,4 - 5,7	3 - 10
Theaflavine	0	0		2 - 6
Flavonole	2	2		1
Andere Polyphenole	3	6		23
Theanin/Aminosäuren	4	je 3		je 3
Peptide/Proteine	15	6		6
Zucker/andere Kohlenhydrate	7	7/4		7/4
Mineralstoffe		5 - 8		5 - 8

1.4 Ziel dieser Arbeit

Heutzutage werden Polyphenole im Allgemeinen mittels MS-Methoden (GC/MS oder LC/MS) oder aber photometrisch (Folin-Ciocalteu-Methode / Gesamtgehalt an Polyphenolen) analysiert. Dies bedarf eines hohen apparativen Aufwandes oder verursacht hohe Kosten durch die verwendeten Chemikalien. Des Weiteren sind die eingesetzten Methoden nicht flexibel einsetzbar. Es besteht keine Möglichkeit, direkt vor Ort Analysen schnell und zuverlässig durchzuführen. Wesentliches Ziel dieser Arbeit ist die Detektion von Polyphenolen mittels eines Biosensors, zum einen in einer Fließinjektionsanalyse per Makroelektrode und zum anderen mittels einer örtlich unbegrenzt und flexibel einsetzbaren „Handheld-Unit“ unter Verwendung einer Dickschichtelektrode (TFT).

Die daraus resultierende Aufgabe ist die Entwicklung eines Biosensors, der spezifisch auf die Gruppe der Polyphenole reagiert. Dabei sollte der Biosensor so unspezifisch sein, dass er alle Gruppen an Polyphenolen erfasst, aber wiederum so spezifisch, dass er keine weiteren chemischen Gruppen erfasst. Die Entwicklung des Biosensors kann in drei Abschnitte gefasst werden. Zum einen muss überprüft werden, welches das geeignete Enzym für die oben dargestellten Zwecke ist. Dies wiederum führt zur Aufgabe, das Enzym derart auf die Oberfläche der Elektroden zu immobilisieren, dass die Elektroden möglichst einfach transportiert werden können. Dazu werden zwei Ansätze zur Immobilisierung von Enzymen

erprobt. Zum einen wird die Verwendung von Polylactid zur Einhüllung und damit zur Immobilisierung des Enzyms auf der Elektroden-Oberfläche geprüft, zum anderen werden Photolinker zum vernetzen (Crosslinking und Co-crosslinking) des Enzyms mit der Oberfläche der Elektroden untersucht. Die Auswirkungen der Immobilisierungstechniken auf die Detektionsfähigkeit des Sensors werden getestet. Dazu werden unterschiedliche Puffer-Lösungen mit verschiedenen pH-Werten überprüft, um die Milieu-Bedingungen für den Biosensor zu optimieren. Zusätzlich muss eine hohe Stabilität und Robustheit des Biosensors, so wie eine gute Lagerfähigkeit des Sensors entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle für die Experimente dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in 2.1.1 bis 2.1.4 aufgeführt.

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
ABTS, Chromophor, Diammonium-Salz	Calbiochem, Schwalbach
Aceton, SupraSolv	Merck, Darmstadt
Aluminiumoxid	Metrohm, Filderstadt
Aminopropyltriethoxysilan, APTES	Fluka, München
Aqua dest.	Pharm.-Chemie Marburg
Aqua bidest.	Pharm.-Chemie Marburg
Bronidox L.	Sigma-Aldrich, München
Carbon Nanotubes, multi-walled	Aldrich, München
Charcoal activated powder puriss. p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Citronensäure Monohydrat, p.a.	KMF Laborchemie, Lohmar
Dichlormethan (für die Gas-chromatographie), SupraSolv	Merck, Darmstadt
Dichlormethan p.a.	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, p.a.	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
1,4-Dioxan	Merck, Darmstadt
Ethylacetat, p.a.	Merck, Darmstadt
4-Fluoro-3-nitrophenylazid	MP, Irvine (USA)
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
D-(+)-Glucose Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd, 50%, wässrige Lösung	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert, 98%	Acros Organics, Geel (Belgien)
Kaliumhydroxid, purris.	Riedel-de Haën, Seelze
Kupferpulver, (Ø ca. 0,04 mm), purris.	Riedel-de Haën, Seelze
1-Methyl-2-pyrrolidon, p.a.	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat, wasserfrei p.a.	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumcarbonat, p.a. wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-Dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, p.a.	Fluka, München
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, Di-Natrium-Salz, Hydrat, 98 %, reduzierte Form	Acros Organics, Geel (Belgien)
Natriumhydroxid, >99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Fluka, München
Salpetersäure, 65 %	Riedel-de Haën, Seelze
Salzsäure, 32%, p.a.	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-97%, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Stärke, löslich, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Span [®] 40, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Span [®] 60, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Span [®] 65, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Sulfo-HSAB	Pierce, Rockford (USA)
Syringaldazin, 99%	Acros Organics, Geel (Belgien)
Tetramethylbenzidin, 99%	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
Thiomersal	Merck, Darmstadt
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Tween 20®, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30% Perhydrol®, zur Analyse	Merck, Darmstadt

2.1.2 Polylactide

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
PLLA	L-Lactide	Biomer, Krailling
Resomer R 203 S	D, L-Lactide	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim
Resomer R 202 S	D, L-Lactide	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim
Resomer L 206 S	L-Lactide	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim

2.1.3 Enzyme

Bezeichnung	Aus	Hersteller
Glucoseoxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Fluka BioChemika, München
Laccase	<i>Agaricus bisporus</i>	Fluka BioChemika, München
Laccase	<i>Rhus vernificera</i>	Sigma, München
Laccase	<i>Trametes versicolor</i>	Fluka BioChemika, München
Peroxidase (HRP)	<i>Armoracia rusticana</i>	Sigma, München

2.1.4 Referenzsubstanzen

Bezeichnung	Hersteller
p-Benzochinon, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Brenzcatechin, p.a.	Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Cyaninchlorid, Rotichrom HPLC	Carl Roth, Karlsruhe
3,4-Dihydroxy-DL-phenylalanin	Sigma, München
(-)-Epicatechin	Carl Roth, Karlsruhe
Gallussäure >98%	Acros Organics, Geel (Belgien)

Bezeichnung	Hersteller
Hydrochinon, purris.	Riedel-de Haën, Seelze
Kaffeesäure, 99+%, Trans-Isomer	Acros Organics, Geel (Belgien)
Phenol, >99,5%, p.a.	Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Pyrogallol	Sigma, München
Quercitin Dihydrat, 99%	Acros Organics, Geel (Belgien)
Resorcin p.a. Ph. Eur.	Riedel-de Haën, Seelze
Resveratrol 99%	Sigma, München

2.1.5 Realproben

Bezeichnung	Hersteller
„China Chun Mee“ grüner Tee, Klassik-Edition	Tee Gschwender, Meckenheim
„Formosa Pi Lo Chun“ grüner Tee, Klassik-Edition	Tee Gschwender, Meckenheim
„China Gunpowder“ grüner Tee, Klassik-Edition	Tee Gschwender, Meckenheim
Aroniasaft „Pomum“	Kelterei Walther, Arnsdorf
Cranberrysaft	Rabenhorst, Unkel

2.1.6 Lösungen und Puffer

Es wurden die in 2.1.6 verwendeten Lösungen und Puffer für die Messungen, sowie für die Enzymlösungen und die Immobilisierung der Enzyme verwendet.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Citrat-Puffer I, pH 5, unkonserviert	tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,41 g	In 800 ml H ₂ O lösen, auf pH 5 mit Natronlauge einstellen und auf 1 l auffüllen, entgasen
Citrat-Puffer II, pH 5, konserviert	tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,41 g Thiomersal 0,5 g	In 800 ml H ₂ O lösen, auf pH 5 mit Natronlauge einstellen und auf 1 l auffüllen, entgasen
Citrat-Puffer III, pH 5, unkonserviert	tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,41 g Natriumchlorid 5,84 g	In 800 ml H ₂ O lösen, auf pH 5 mit Natronlauge einstellen und auf 1 l auffüllen
Stammlösung I Natriumdihydrogenphosphat 0,1 M	Natriumdihydrogenphosphat 12,0 g	In 800 ml H ₂ O lösen und auf 1 l auffüllen
Stammlösung I Di-Natriumhydrogenphosphat 0,1 M	Dinatriumhydrogenphosphat 14,2 g	In 800 ml H ₂ O lösen und auf 1 l auffüllen
Stammlösung II Natriumdihydrogenphosphat 0,1 M	Natriumdihydrogenphosphat 12,0 g Natriumchlorid 5,84 g	In 800 ml H ₂ O lösen und auf 1 l auffüllen
Stammlösung II Di-Natriumhydrogenphosphat 0,1 M	Dinatriumhydrogenphosphat 14,2 g Natriumchlorid 5,84 g	In 800 ml H ₂ O lösen und auf 1 l auffüllen
Stammlösung III Natriumdihydrogenphosphat 1/15 M	Natriumdihydrogenphosphat 8,00 g Natriumchlorid 5,84 g	In 800 ml H ₂ O lösen und auf 1 l auffüllen
Stammlösung III Di-Natriumhydrogenphosphat 1/15 M	Dinatriumhydrogenphosphat 9,47 g Natriumchlorid 5,84 g	In 800 ml H ₂ O lösen und auf 1 l auffüllen
Phosphat-Puffer I, pH 7, unkonserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung I 388 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung I 612 ml	Stammlösungen mischen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Phosphat-Puffer II, pH 7, konserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung I 388 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung I 612 ml Thiomersal 0,5 g	Eine Stammlösung vorlegen, Thiomersal zufügen und lösen, zweite Stammlösung zufügen und mischen
Phosphat-Puffer III, pH 7, unkonserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung II 388 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung II 612 ml	Stammlösungen mischen
Phosphat-Puffer IV, pH 7,2, unkonserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung III 274 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung III 726 ml	Stammlösungen mischen
Phosphat-Puffer V, pH 7,2, konserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung III 274 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung III 726 ml Thiomersal 0,5 g	Eine Stammlösung vorlegen, Thiomersal zufügen und lösen, zweite Stammlösung zufügen und mischen
Phosphat-Puffer VI, pH 6,2, unkonserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung I 816 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung I 184 ml	Stammlösungen mischen
Phosphat-Puffer VII, pH 6,2, unkonserviert	Natriumdihydrogenphosphat-Stammlösung II 816 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung II 184 ml	Stammlösungen mischen
Acetat-Puffer pH 4,5	Natriumacetat 8,204 g Essigsäure 0,1 M	Natriumacetat in 800 ml H ₂ O lösen, auf 1 l auffüllen 449 ml Natriumacetat-Lsg. + 551 ml Essigsäure mischen
TRIS-Puffer pH 7	TRIS 12,11 g HCl 0,1 M	In 800 ml H ₂ O lösen und mit HCl pH-Wert auf 7 einstellen, auf 1 l auffüllen

Bezeichnung	Zusammensetzung		Herstellung
Acetat-Citrat-Puffer pH 4,9	Natriumacetat Citronensäure	0,1 M 0,1 M	Die beiden Lösungen gegeneinander auf pH 4,9 einstellen
TMB-Lösung	TMB DMSO	10 mg 1 ml	TMB in DMSO lösen
H ₂ O ₂ -Lösung	H ₂ O ₂ , 30 %	0,1 ml	Auf 1 ml mit H ₂ O auffüllen
Gesättigte NaCO ₃ - Lösung	NaCO ₃		In 100 ml warmem demin. Wasser zugeben, bis sich kein NaCO ₃ mehr löst
ABTS-Lösung 3 mM	ABTS	0,019 g	In 12 ml Citrat-Puffer III lösen
FNPA-Lösung	FNPA	1 mg	In 0,1 ml Methanol lösen
Sulfo-HSAB-Lösung	Sulfo-HSAB	1 mg	In 0,1 ml Phosphat-Puffer IV lösen
Hydrochinon- Stammlösung 100 mM	Hydrochinon	1,1011 g	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen
Hydrochinon- Stammlösung 10 mM	Hydrochinon	0,1101 g	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen
Brenzcatechin- Stammlösung 100 mM	Brenzcatechin	1,1011 g	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen
Brenzcatechin- Stammlösung 10 mM	Brenzcatechin	0,1101 g	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen
Kaffeesäure- Stammlösung 100 mM	Kaffeesäure	1,8016 g	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen
Gallussäure- Stammlösung 100 mM	Gallussäure	1,7102 g	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen
(-)-Epicatechin- Stammlösung 10 mM	(-)-Epicatechin	29,027 mg	Mit jeweils 100 ml eines der hergestellten Puffern auffüllen

2.1.7 Geräte

Die in 2.1.7 aufgeführten Geräte sind für die Arbeit verwendet worden.

Bezeichnung	Firma
Analysenwaage CP225D-0CE max.220g	Sartorius, Göttingen
Elektrochemischer Detektor 656	Metrohm, Filderstadt
Glassy-Carbon-Elektrode, Ø 5 mm	Metrohm, Filderstadt
Glassy-Carbon-Elektrode, Ø 3 mm	Metrohm, Filderstadt
Injektionsventil mit Probenschleife (20 µl)	Knauer, Berlin
Magnetrührer Typ RMH K	Gerhardt, Königswinter
Magnetrührer Ikamag Ret-G	Ika-Labortechnik, Staufen
pH-Meter CG 701	Schott-Geräte, Mainz
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Platereader Multiskan EX	Thermo Electron Corporation, Waltham (USA)
Platin-Elektrode, Ø 1 mm	Metrohm, Filderstadt
Potentiostat PalmSens	Palm Instruments BV, Houten (Niederlande)
Referenzelektrode – Ag/AgCl	Metrohm, Filderstadt
Rührwerk RW11 basic „Lab egg“	Ika-Labortechnik, Staufen
Schlauchpumpe	Abimed Gilson, Langenfeld
Schlauchpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Sechswegeventil	Knauer, Berlin
Spektrometer Uvikon 810	Kontron, München
Trockenschrank T6030	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Bransonic 12 Typ B16	PCE-Group oHG, Meschede
Ultraturrax	Janke & Kunkel Ika-Werk, Staufen
UV-Lampe, wassergekühlt	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	KNF Neuberger Laboport, Freiburg
Vakuumpumpe	KNF LAB Laboport, Freiburg
Vortexer	Bioblock Scientific, Illkirch (Frankreich)
Waage max. 800g	Mettler Toledo, Giessen

2.1.8 Schläuche

Es wurden Schläuche der Firma Ismatec (Wertheim-Mondfeld) verwendet. Es wurde im Allgemeinen ein Teflonschlauch verwendet. Für die Peristaltikpumpen wurden folgende Schläuche verwendet:

Name	Durchmesser [mm]
Tygon® ST R-3607	0,64
Tygon® MHSL 2001	0,64

2.2 Systemaufbau

2.2.1 Systemaufbau mit Wall-Jet-Zelle

In Abbildung 2.2.1 ist der schematische Aufbau des Systems dargestellt. Das komplette Testsystem ist in einem Faradayschen Käfig untergebracht und von Stromschwankungen durch einen Netzfilter abgesichert.

Das Testsystem kann in drei verschiedene Einheiten unterteilt werden. Die erste Einheit umfasst den Puffer, die Pumpe und das Injektionsventil. Die zweite Einheit umfasst die Proben (zusammen mit dem Puffer und der Spüllösung) sowie das Sechs-Wege-Ventil und eine weitere Pumpe. Die dritte Einheit bildet der elektrochemische Detektor mit dem Potentiostaten.

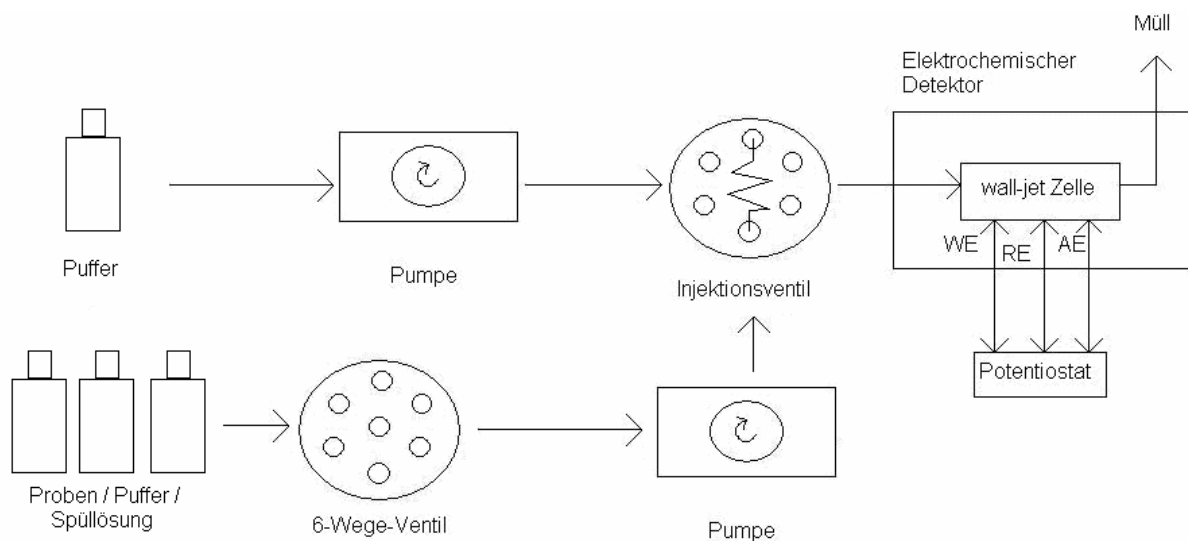


Abbildung 2.2.1 Schematischer Aufbau des Testsystems
(WE: Arbeitselektrode, RE: Referenzelektrode, AE: Hilfselektrode)

Aufgrund dieser modularen Bauweise ist es möglich, an den einzelnen Einheiten Veränderungen vorzunehmen, ohne die anderen Einheiten verändern zu müssen.

Im Gegensatz zum oben dargestellten Aufbau des Testsystems wurde nur eine Pumpe verwendet, die sowohl den Puffer durch das Testsystem transportiert, als auch die Proben bzw. Spüllösung zum Injektionsventil hin transportiert.

Dieser Aufbau hat sowohl einen Vor- als auch einen Nachteil. Der Vorteil besteht darin, dass nur eine Pumpe verwendet werden muss, so dass im Faradayschen Käfig mehr Platz vorhanden ist. Daraus ergibt sich jedoch der Nachteil, dass die Probenlösung während der Messdauer ständig abgepumpt wird, was zu einem hohen Chemikalien-Verbrauch führen würde. Aus diesem Grund ist ein Sechs-Wege-Ventil zwischen der Probenlösung und der Pumpe installiert worden. Damit ist es möglich, zwischen verschiedenen Lösungen zu wechseln, ohne die Pumpe stoppen zu müssen. Bei einem Wechsel der Lösungen ohne Verwendung des Sechs-Wege-Ventils muss entweder die Pumpe gestoppt werden, oder aber es wird Luft in das Testsystem transportiert. Diese Luft wiederum würde in der Wall-Jet-Zelle akkumuliert, so dass es zu Signalstörungen während der Messungen kommen würde.

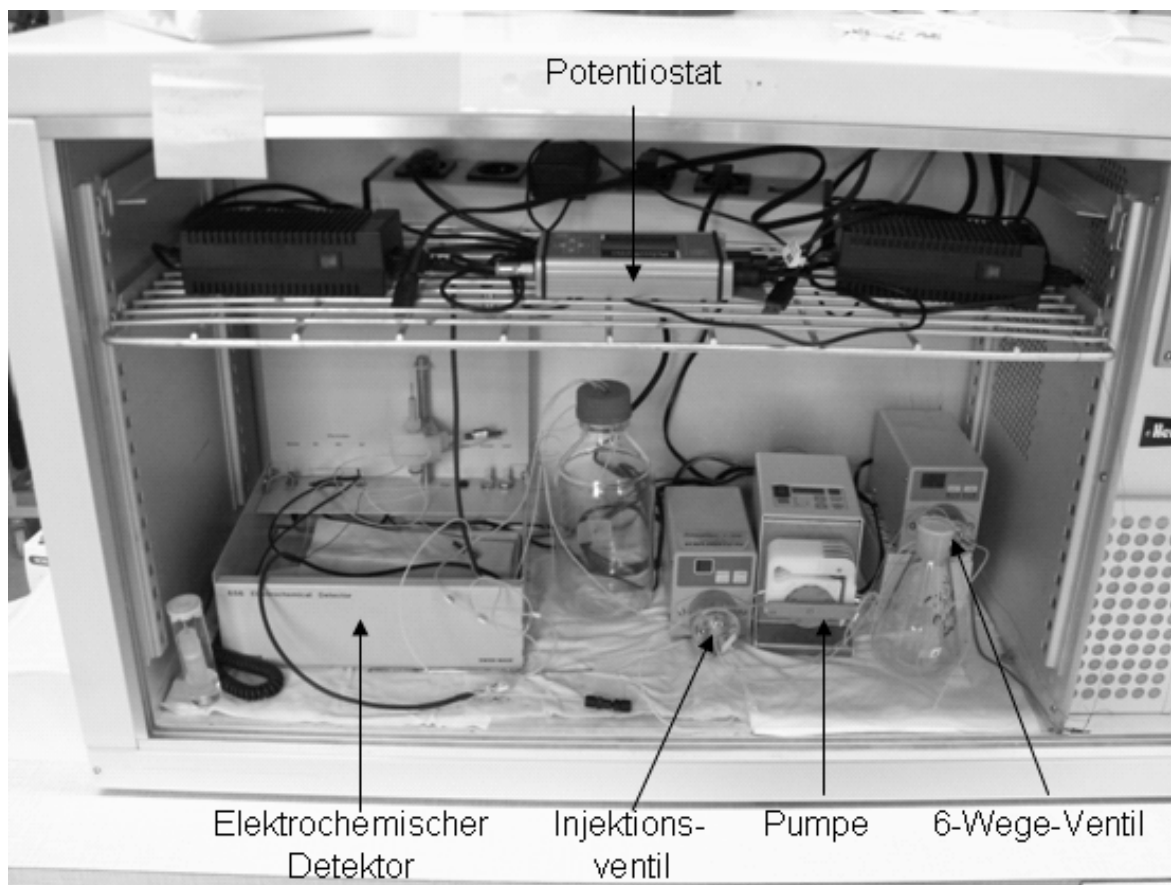


Abbildung 2.2.2 Aufbau des Testsystems

Als Faradayscher Käfig wurde ein alter Brutschrank verwendet (elektrische Bauteile waren ausgebaut); Zum Vervollständigen des Faradayschen Käfigs wurde die Vorderseite mit einem Gitter verschlossen (In diesem Bild zu besserer Darstellung nicht vorhanden)

Ein zusätzlicher positiver Effekt durch die Verwendung des Sechs-Wege-Ventils ergibt sich daraus, dass alle Schläuche durch den ständigen Transport von Puffer oder Spüllösungen (im Allgemeinen: H_2O) gereinigt werden, so dass es zu keiner Kontamination der Testlösung durch eine vorherige Probe kommen kann.

In Abbildung 2.2.3 ist die Wall-Jet-Zelle dargestellt. In diesem Fall handelt es sich um eine Drei-Elektroden-Anordnung. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ist der Eluenteneinlass genau gegenüber der Arbeitselektrode positioniert. Die Hilfselektrode und die Referenzelektrode sind im 90° -Winkel zur Arbeitselektrode angebracht. Ebenfalls im 90° -Winkel ist der Eluent-Auslass angebracht.

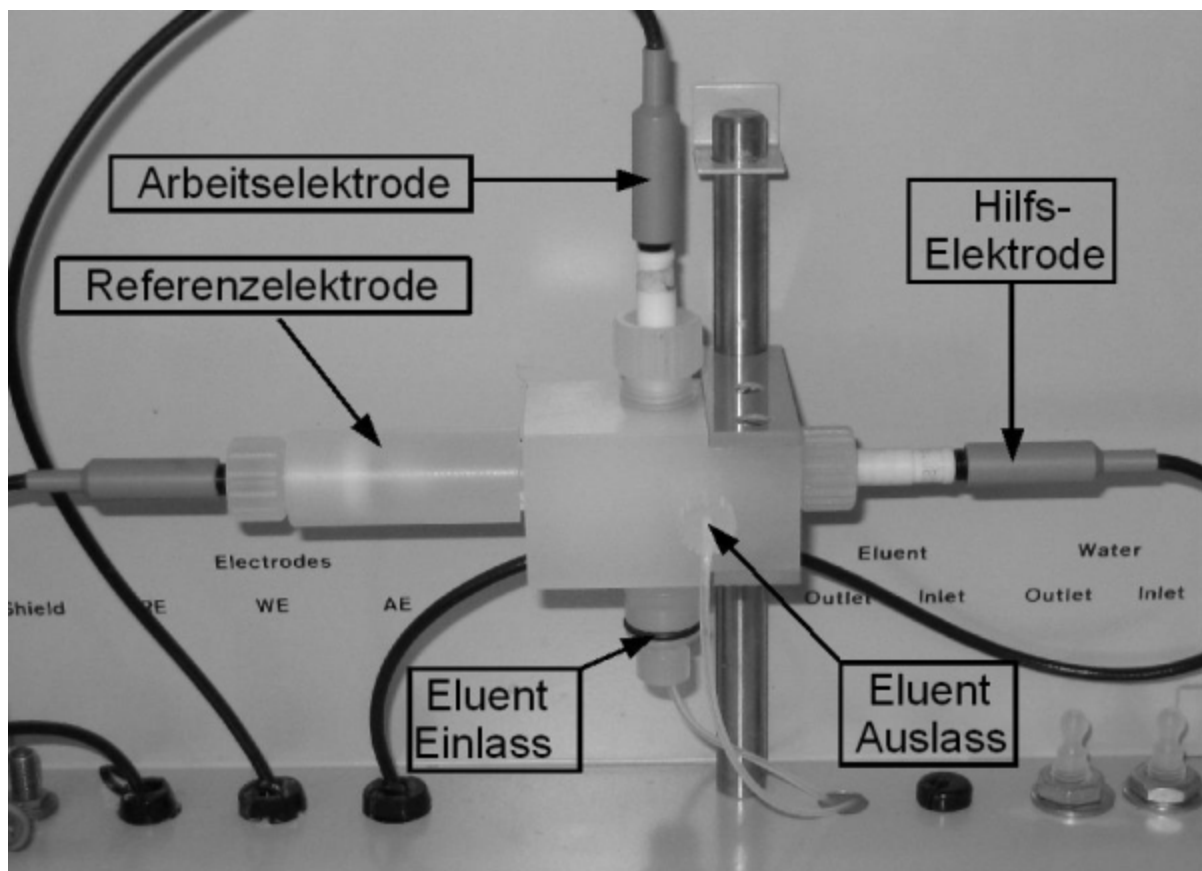


Abbildung 2.2.3 Äußere Ansicht einer Wall-Jet-Zelle mit einer Drei-Elektroden-Anordnung

Der Vorteil dieser Anordnung ist ein besseres Anströmverhältnis des Eluenten auf die Arbeitselektrode (siehe dazu auch Abbildung 2.2.4). Im Gegensatz zu einer Arbeitselektrode, an dem der Eluent vorbeigeleitet und somit die Probe nicht vollständig erfasst wird, wird hier die gesamte Probe erfasst. Daraus ergibt sich eine höhere Sensitivität. Des Weiteren wird so der Abtransport von Reaktionsprodukten auf der gesamten Elektroden-Oberfläche gewährleistet.

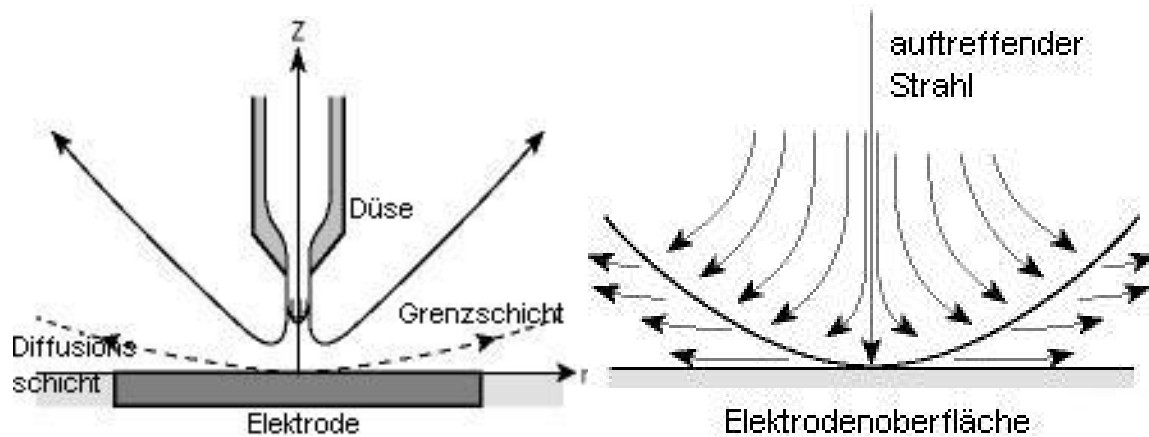


Abbildung 2.2.4 Strömungsverhältnisse an der Arbeitselektrode in einer Wall-Jet-Zelle

Durch dieses Anström-Profil ergibt sich für einen Biosensor die Problematik, dass das Enzym bei schlechter Immobilisierung von der Elektroden-Oberfläche abgespült werden kann.

Als Arbeitselektrode wird sowohl eine Platin-Elektrode eingesetzt wie auch eine Glassy-Carbon-Elektrode (GC-Elektrode). Die Hilfselektrode besteht ebenfalls aus Glassy-Carbon. Bei der Referenzelektrode handelt es sich um eine Ag/AgCl-Elektrode.

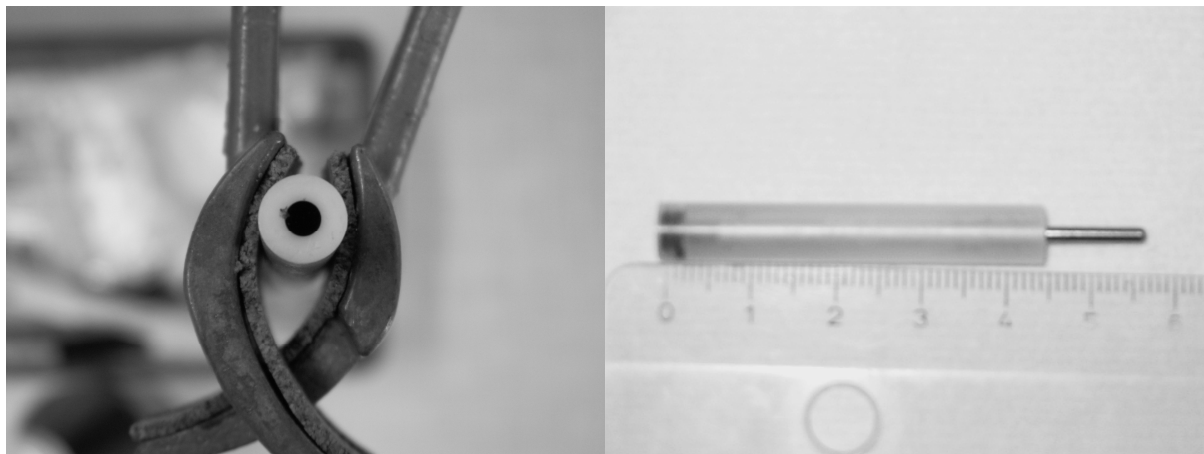


Abbildung 2.2.5 Makroelektrode für die Wall-Jet Zelle

Es handelt sich hierbei um eine Glassy-Carbon-Elektrode mit einem Elektrodendurchmesser von 3 mm.

2.2.2 TFT-Sensoren

Als TFT-Sensoren wurden Sensoren der Firma BVT Technologies (Brno, Tschechische Republik) und der Firma BST Bio Sensor Technology (Berlin) verwendet.

Bei den BVT-Sensoren handelt es sich um amperometrische Dickschichtsensoren, die auf einer Keramikoberfläche Arbeits-, Hilfs-, und Referenzelektrode aufgedruckt haben.

Während bei den Sensoren für die Hilfselektrode und die Referenzelektrode immer die gleichen Materialien verwendet worden sind (Hilfselektrode: Pt/Au 15/85%;

2. Material und Methoden

Referenzelektrode: Ag/AgCl 60/40%), wurden drei unterschiedliche Arbeitselektroden getestet.

Dabei handelt es sich um zwei verschiedene Kohlenstoff-Modifikationen (Sensor: AC1.W4.R1 und AC1.W5.R1) und um eine Platin-Arbeitselektrode (Sensor: AC1.W2.R1).

In Abbildung 2.2.6 ist ein TFT-Sensor der Firma BVT mit Abmessungen dargestellt.

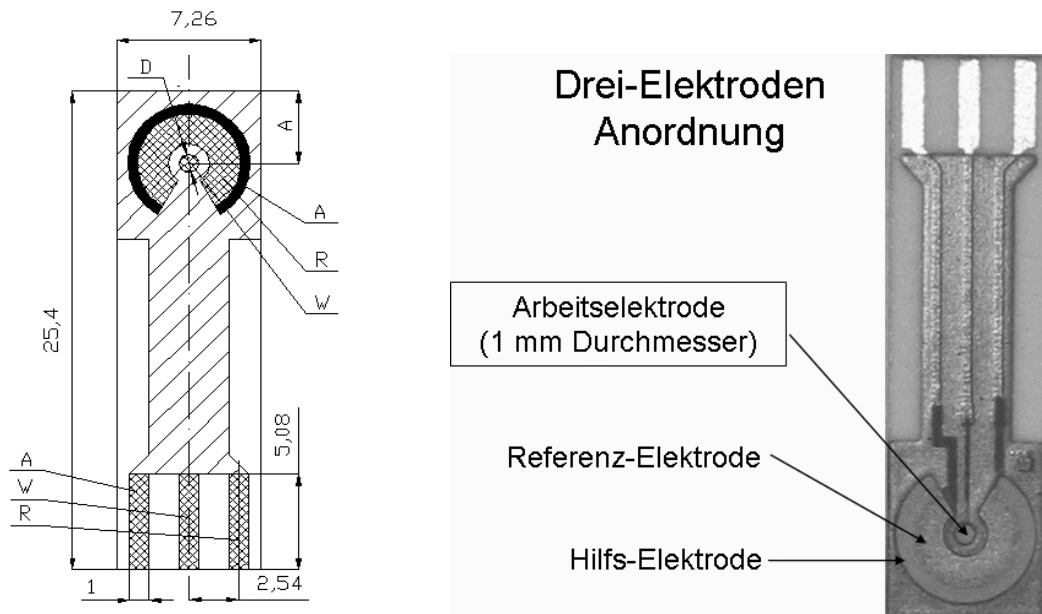


Abbildung 2.2.6 Aufbau eines BVT-Sensors

Die Abmessungen eines Sensors sind 25,4 mm x 7,26 mm, die Arbeitselektrode (W) hat einen Durchmesser von 1 mm. R: Referenzelektrode, A: Hilfslektrode (Quelle: BVT, 2008)

Bei den BST-Sensoren handelt es sich um eine Zwei-Elektroden-Anordnung bestehend aus Arbeitselektrode und Referenzelektrode. Die Referenzelektrode besteht aus Silber/Silberchlorid. Bei der Arbeitselektrode handelt es sich um Kohlenstoff. Die Größenverhältnisse entsprechen denen der BVT-Sensoren.

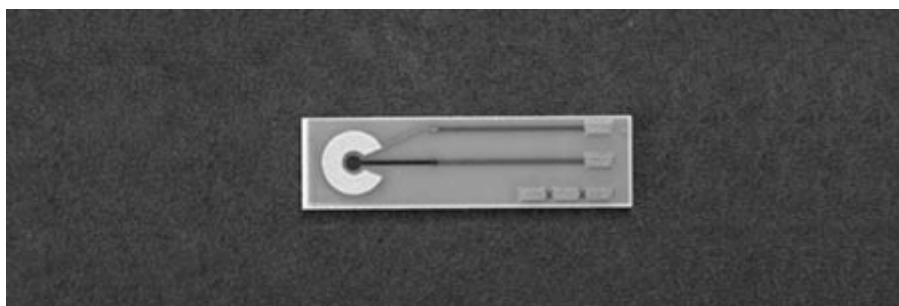


Abbildung 2.2.7 TFT-Sensor der Firma BST; deutlich erkennbar die Zwei-Elektrodenanordnung

2.2.3 Messungen mit TFT-Sensoren

Durch die flexible Verwendungsmöglichkeit der TFT-Sensoren gibt es für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen zwei Möglichkeiten für den Einsatz dieser Sensoren.

Zum einen besteht die Möglichkeit, den Sensor in eine Probelösung zu tauchen. Wahlweise kann dies mit oder ohne einen Rührer geschehen (siehe Abb. 2.2.8).

Bei einer Verwendung eines Rührers wurde anstatt eines Magnetrührers ein Rührwerk verwendet, um evtl. magnetische Einflüsse des Magnetrührers auf die Messwerte zu unterbinden.

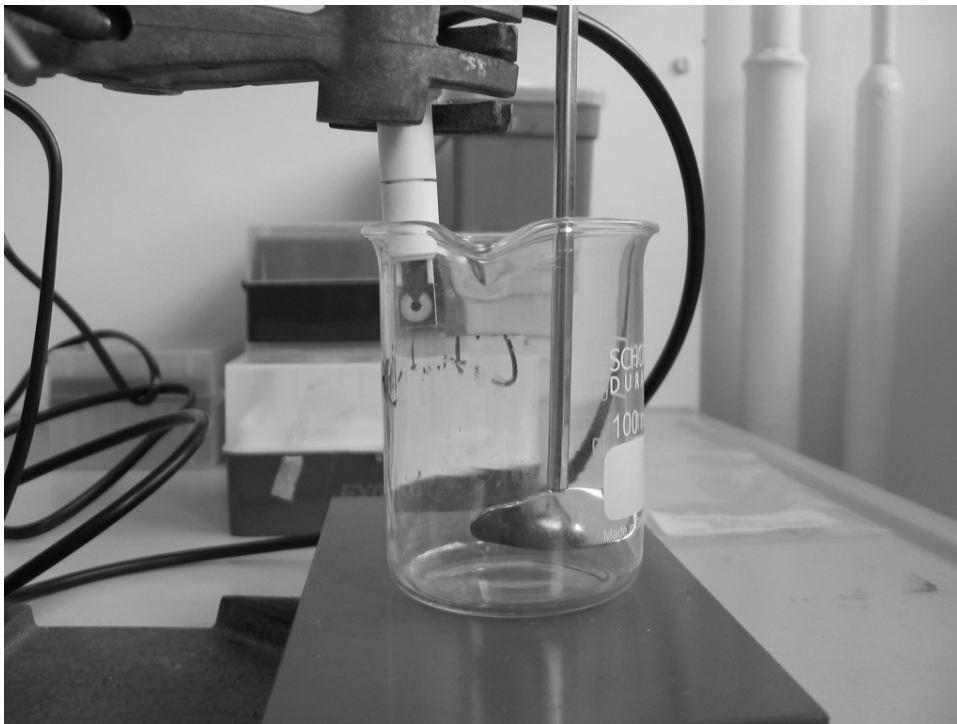


Abbildung 2.2.8 Aufbau einer Messanordnung

Der TFT-Sensor wird in die Probelösung eingetaucht (mit Rührer). Das Volumen der analysierten Lösung betrug versuchsbedingt 80 ml. Es wurde mit einer Rührgeschwindigkeit von ca. 200 U/min gearbeitet. Eine genaue Ermittlung der Rührgeschwindigkeit war aufgrund des verwendeten Gerätes nicht möglich.

Der in 2.2.8 gezeigte Messaufbau wird zum Beispiel bei der Messung von cyclischen Voltammogrammen verwendet.

Die andere Möglichkeit des Messaufbaus ähnelt dem Testsystem mit dem elektrochemischen Detektor (siehe Abbildung 2.2.1), wobei anstelle des elektrochemischen Detektors eine TFT-Sensor-Halterung verwendet wird (siehe Abbildung 2.2.9). Der übrige Aufbau ist identisch. Der Aufbau der Halterung entspricht einer Wall-Jet-Zelle. Der Eluent wird durch eine Bohrung auf die Arbeitselektrode des TFT-Sensors gelenkt. Seitlich des TFT-Sensors befindet sich der Eluentenauslass.

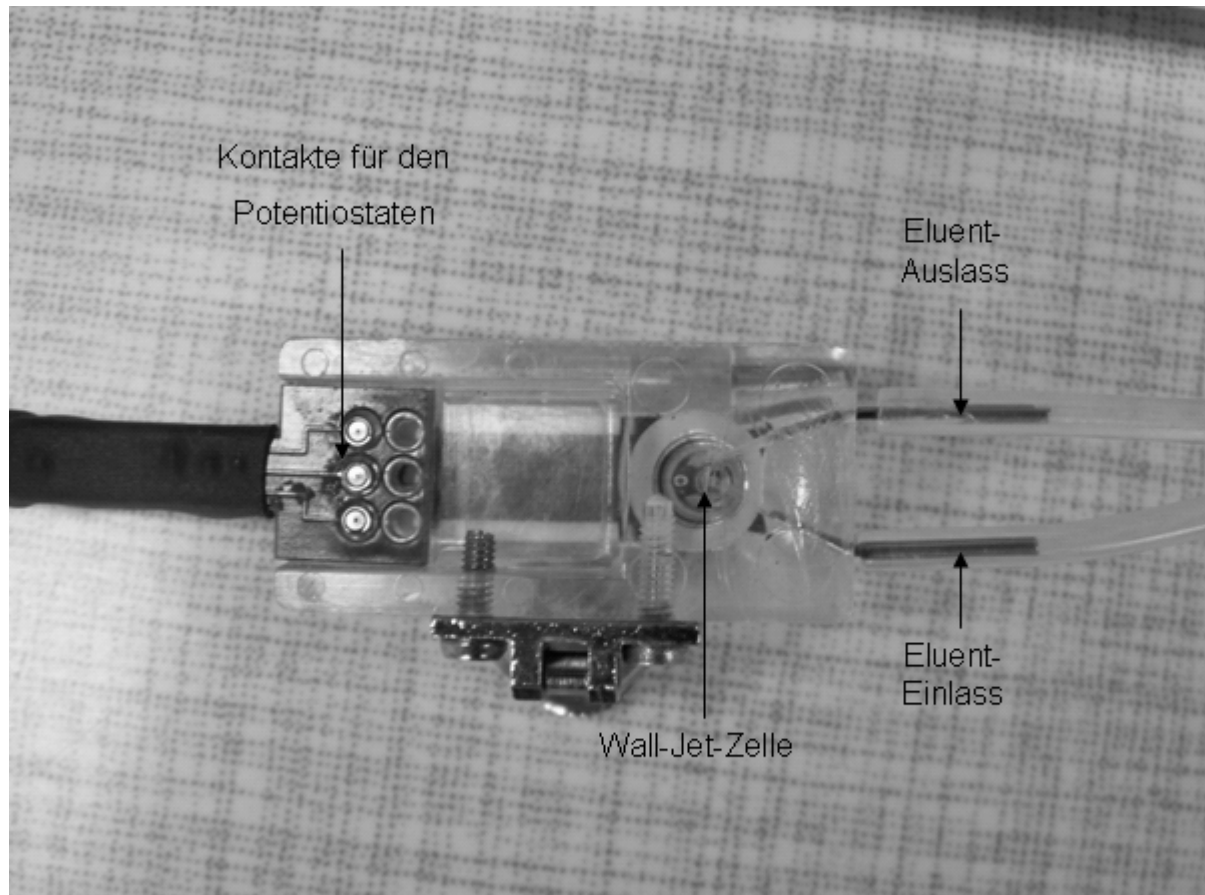


Abbildung 2.2.9 TFT-Sensor-Halterung für BVT-Sensoren

Von der Pumpe und dem dahinter geschalteten Injektionsventil erfolgt der Zufluss von Puffer und Probelösungen durch den Eluenteneinlass. Über ein abgeschirmtes Kabel wird die Halterung an den Potentiostaten angeschlossen und gesteuert

2.2.4 Bestimmung der Fließgeschwindigkeit

Da die genutzten Peristaltikpumpen keine Einstellmöglichkeit für die Fließgeschwindigkeit bzw. nicht auf die Fließgeschwindigkeit kalibriert waren, musste die Fließgeschwindigkeit experimentell bestimmt werden:

Die verwendete Pumpe wurde auf eine bestimmte Umdrehungszahl eingestellt, z.B. 5 rpm. Die Zeit, die benötigt wurde, um 10 ml H₂O zu pumpen, wurde gestoppt. Über folgenden Dreisatz kann man dann die Fließgeschwindigkeit in Korrelation zur Drehzahl der Pumpe setzen:

Formel 6

$$t_f = \frac{V_e}{F} \Rightarrow x_u = \frac{U_e}{t_e} * t_f$$

t_f =Hilfsvariable, V_e =experimentell eingesetztes Volumen, F =Fließgeschwindigkeit, U_e =experimentell verwendete Drehzahl, t_e =experimentell ermittelte Zeit, die gebraucht wurde, um das Volumen V_e zu pumpen, x_u =gesuchte Drehzahl der Pumpe für die Fließgeschwindigkeit F

2.3 Methoden

2.3.1 Immobilisierung von Enzymen auf NHS-HiTrap®-Kartuschen

Zur Immobilisierung von Enzymen auf eine NHS-aktivierte HiTrap®-Kartusche wurde zuerst ein Vorbereitungsschritt durchgeführt. In den Kartuschen enthaltenes Isopropanol, welches das Gel gegen Austrocknung und die Aktivgruppen schützt, muss entfernt und das Gel muss aktiviert werden. Zum Austausch und zur Aktivierung wurden die Kartuschen mit 1 mM Salzsäure (3 x 2 ml) mit einer Flußrate von 1 ml/min gespült, bis kein Isopropanol mehr in den Kartuschen enthalten war. Anschließend wurde die Kartusche mit dem Enzym-Puffer (Phosphat-Puffer III) zwei Minuten gespült.

Dann wurde die vorbereitete Enzym-Lösung (siehe 2.3.4.1) mittels eines Kreislaufsystems für 15 min mit einem Fluss von 1 ml/min durch die Kartusche gepumpt. Nach dem Durchpumpen der Enzym-Lösung wurde erneut mit Phosphatpuffer III 2 min gespült. Zur Desaktivierung der aktiven Gruppen wurde wie folgt vorgegangen (Flussrate: 1 ml/min):

- a. Durchpumpen von 10 ml Glycin-Lösung, 0,5 M
- b. Inkubieren der Lösung für 10 min
- c. Durchpumpen von 10 ml Glycin-Lösung, 0,5 M
- d. Inkubieren der Lösung für 15 min
- e. 10 min spülen mit Lagerpuffer (Phosphatpuffer I)

Die Kartusche wurde bei +4°C gelagert.

2.3.2 Reinigung der Oberflächen der Makroelektroden

Der Oberflächenzustand der Elektrode ist für eine Beschichtung entscheidend. Der Zustand der Elektrodenoberfläche wirkt sich direkt auf die Immobilisierungsfähigkeit der Enzymkomponente auf der Elektrode aus. Zusätzlich wird durch die Reinigung der Elektrode für alle Messungen eine immer gleichbleibende Anfangsbedingung geschaffen.

Die Reinigung der Oberfläche der Makroelektroden erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Elektrode mit Hilfe eines fusselfreien Tuches, welches mit Aceton getränkt wurde, von Polymerrückständen und Fetten gereinigt.

In einem zweiten Schritt wurde die Elektrode mit Aluminiumoxid als Schleifmittel poliert. Das Polieren mit Aluminiumoxid stellt sicher, dass die Elektrodenoberfläche frei von entstandenen Reaktionsprodukten ist. Wie vom Hersteller der Elektroden vorgegeben, wurden die Oberflächen mindestens drei Minuten poliert. Nach dem Polieren wurde das Schleifmittel mit dest. Wasser abgespült und mit einem fusselfreien Tuch getrocknet. Gegebenenfalls

wurde die Elektrode jetzt erneut mit Aceton gereinigt, falls Fettablagerungen auf der Oberfläche der Elektrode zu erkennen waren.

2.3.3 Reinigung der Dickschichtsensoren

Da die Dickschichtsensoren vom Hersteller in Blister verpackt werden, sind sie ausreichend geschützt und eine aufwendige Reinigung kann entfallen. Die Sensoren wurden aus den Blistern entnommen, mit demin. Wasser gespült, mit Druckluft getrocknet und dann verwendet. Da die Sensoren nur für jeweils eine Beschichtung genutzt worden sind, mussten sie auch nicht für erneute Beschichtungen gereinigt werden. Die Sensoren sind mit einer Lackschicht überzogen (außer den Elektroden und Kontakten). Deshalb wurde darauf verzichtet, die Sensoren mittels eines Lösungsmittels (z.B. Aceton) von evtl. vorhanden Fetten zu reinigen.

2.3.4 Messungen mit einer NHS-HiTrap®-Kartusche

Der Aufbau der Messapparatur entspricht im Wesentlichen dem Systemaufbau nach 2.2.1. In der ersten Einheit wird kontinuierlich mit einem Fluss von 0,5 mL/min Puffer durch das Injektionsventil in Richtung der Wall-Jet-Zelle transportiert. Die zweite Einheit liefert die Proben- bzw. Spüllösung zum Injektionsventil. Es ist jedoch zusätzlich eine Kartusche zwischen Injektionsventil und elektrochemischem Detektor eingebaut. Der elektrochemische Detektor wird vom Potentiostaten gesteuert und liefert das gemessene Signal an den Potentiostaten, der (siehe Abbildungen 2.3.1 und 2.3.2) wiederum das Signal an den angeschlossenen Pocket-PC oder PC überträgt.

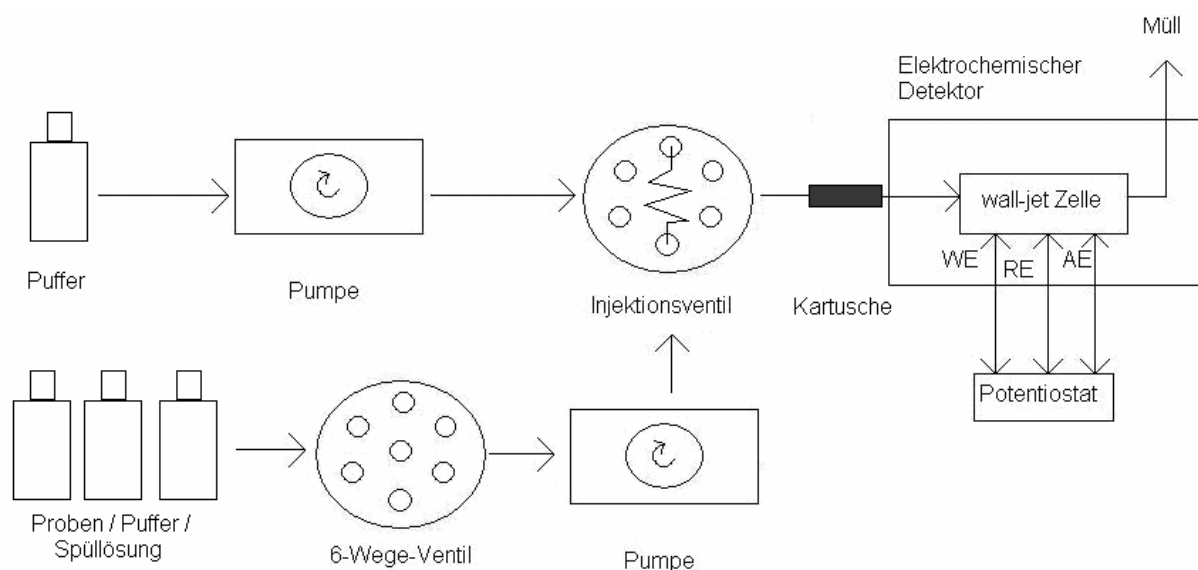


Abbildung 2.3.1 Schematische Darstellung der Messapparatur mit NHS-HiTrap®-Kartusche

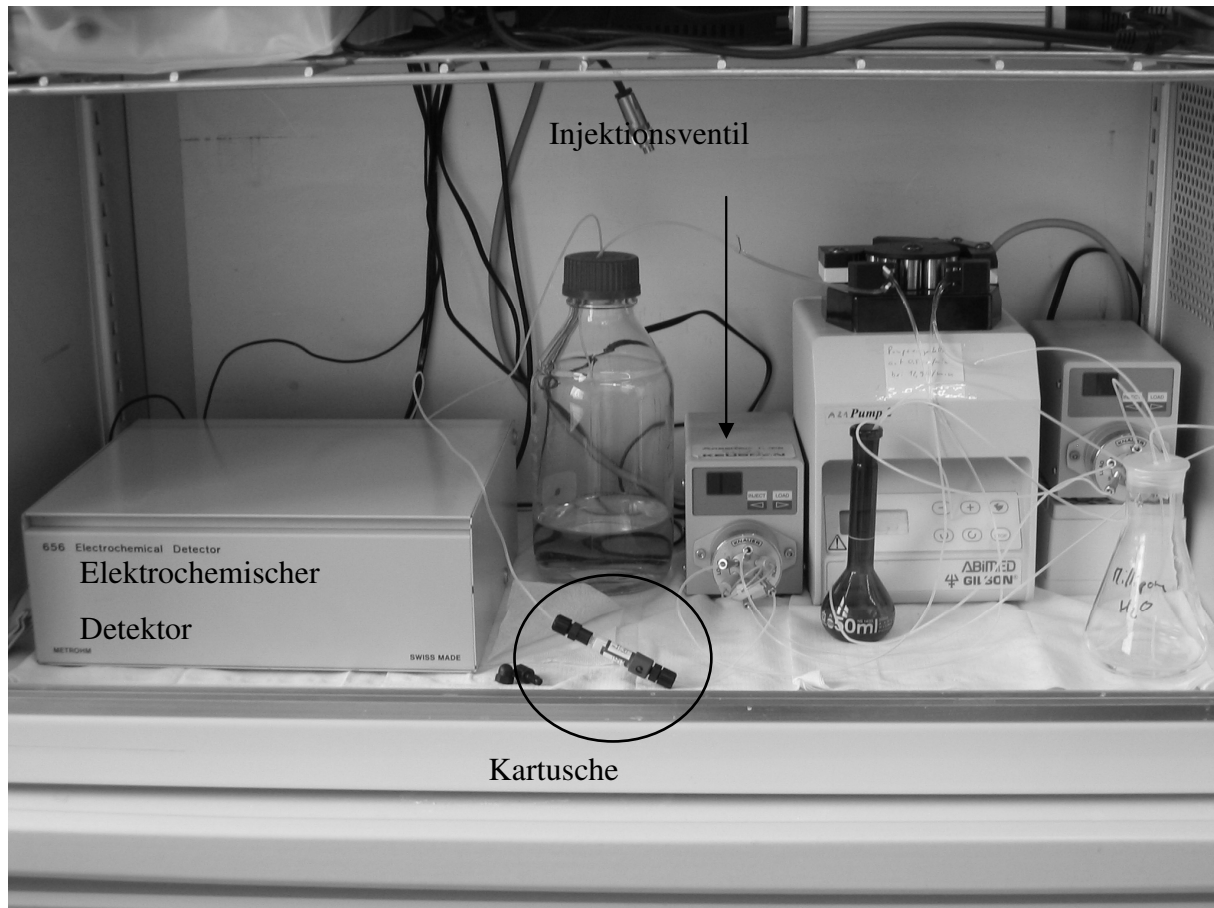


Abbildung 2.3.2 Messapparatur mit NHS-HiTrap[®]-Kartusche

2.3.5 Herstellung von Enzym-Lösungen

Es wurden verschiedene Enzyme und Enzymkonzentrationen verwendet. Abhängig von der benutzten Methode wurden verschiedene Puffer eingesetzt.

2.3.5.1 Peroxidase in Pufferlösung für NHS-HiTrap[®]-Kartuschen

1 mg des Enzyms wurden in einem verschließbaren Röhrchen eingewogen und in 5 ml Phosphatpuffer III gelöst. Dazu wurde die Probe im Vortexer geschüttelt, bis das Enzym vollständig gelöst vorlag. Die Lagerung der so hergestellten Enzymlösung erfolgte für maximal eine Woche bei +4°C.

2.3.5.2 Laccase aus *Trametes versicolor* in Pufferlösung

Es wurden verschiedene Konzentrationen der Laccase-Lösung hergestellt. 5 mg, 10 mg, 25 mg, 35 mg, 50 mg und 100 mg des Enzyms in einem Epi-Cap[®] eingewogen und in 1 ml Phosphat-Puffer IV gelöst. Dazu wurde die Probe im Vortexer geschüttelt, bis das Enzym vollständig gelöst vorlag. Die Lagerung der so hergestellten Enzymlösung erfolgte für maximal eine Woche bei +4°C.

2.3.5.3 *Laccase aus Agaricus bisporus in Pufferlösung*

5 mg und 50 mg des Enzyms wurden in einem Epi-Cap[®] eingewogen und in 1 ml Phosphatpuffer IV gelöst. Dazu wurde die Probe im Vortexer geschüttelt, bis das Enzym vollständig gelöst vorlag. Die Lagerung der so hergestellten Enzymlösung erfolgte für maximal eine Woche bei +4°C.

2.3.5.4 *Laccase aus Rhus vernificera in Pufferlösung*

5 mg, 25 mg und 50 mg des Enzyms wurden in einem Epi-Cap[®] eingewogen und in 1 ml Phosphatpuffer IV gelöst. Dazu wurde die Probe im Vortexer geschüttelt. Da auch bei längerem vortexen Schwebteile vorhanden waren, wurde die Lösung mit Schwebteilen bei +4°C gelagert. Vor der Entnahme der Lösung wurde darauf geachtet, dass sich die Schwebteile auf dem Boden abgesetzt haben und keine Schwebteile aus der Lösung entnommen wurden.

Des Weiteren wurden 25 mg des Enzyms mit 1 ml Citrat-Puffer III versetzt und im Vortexer gerührt. Die in der Lösung wurde für maximal eine Woche bei +4°C gelagert. Vor der Entnahme der Lösung wurde darauf geachtet, dass sich alle Schwebteile auf dem Boden abgesetzt haben.

2.3.5.5 *Glucoseoxidase aus Aspergillus niger in Pufferlösung*

10 mg des Enzyms Glucoseoxidase wurden in einem Epi-Cap[®] eingewogen und in 1 ml Phosphat-Puffer IV gelöst. Dazu wurde die Probe im Vortexer geschüttelt, bis das Enzym vollständig gelöst vorlag. Die Lagerung der so hergestellten Enzymlösung erfolgte bei +4°C.

2.3.6 Herstellung von funktionalisierten Carbon Nanotubes

Zur Funktionalisierung der MWCNT sind verschiedene Methode angewendet worden. Alle Methoden beruhen auf der Oxidation der Carbon Nanotubes. Dabei werden in die Carbon Nanotubes Carboxy- und Carbonylgruppen eingefügt.

2.3.6.1 *Funktionalisierung mittels Säure und Ultraschallbad*

Dabei handelt es sich um zwei verschiedene Ansätze. Für den ersten Ansatz wurde zur Herstellung von funktionalisierten Carbon Nanotubes eine Mischung aus Schwefelsäure und Salpetersäure verwendet, während für den zweiten Ansatz eine Mischung aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid verwendet wurde [Chenxin et al., 2004, Abraham, 2005].

Erster Ansatz:

480 mg Carbon Nanotubes wurden mit 480 ml einer Mischung aus konz. Schwefelsäure (95-97%) und konz. Salpetersäure (Mischungsverhältnis 3+1) versetzt. Das CNT/Säure-Gemisch wurde dann 24 h bei 40°C in einem temperierbaren Ultraschallbad gegeben. Während der 24 h erwärmte sich das Ultraschallbad auf 60°C. Nach den 24 h wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 500 ml dest. Wasser verdünnt. Dieses verdünnte Gemisch wurde zentrifugiert (5000 rpm) und die darüberstehende klare Flüssigkeit abdekantiert. Es wurde erneut 500 ml dest. Wasser hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt bis das Waschwasser einen neutralen bis leicht sauren pH-Wert erreicht hatte (pH 6-7). Die CNT wurden im Trockenschrank bei 100°C getrocknet und konnten anschließend direkt verwendet werden.

Zweiter Ansatz:

500 mg Carbon Nanotubes wurden mit 500 ml einer Mischung aus konz. Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid 30%-ig (Mischungsverhältnis 4+1) versetzt. Das CNT/Säure-Gemisch wurde dann für 6 h bei 40°C in einem temperierbaren Ultraschallbad gegeben. Dabei erwärmte sich das Ultraschallbad auf 60°C. Nach den 6 h wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 500 ml dest. Wasser verdünnt. Dieses verdünnte Gemisch wurde zentrifugiert (5000 rpm) und die darüberstehende klare Flüssigkeit abdekantiert. Es wurde 500 ml dest. Wasser hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt bis das Waschwasser einen neutralen bis leicht sauren pH-Wert (pH 6-7) erreicht hatte. Die CNT wurden im Trockenschrank bei 100°C getrocknet und konnten anschließend direkt verwendet werden.

2.3.6.2 Funktionalisierung mit konzentrierter Salpetersäure

In einem 250 ml-Rundkolben wurden 500 mg MWCNT und 3 Siedesteine vorgelegt. Es wurde 50 ml 65%-ige Salpetersäure zugefügt. Unter Rückfluss wurde das Gemisch 6 h gekocht und dann bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde die Salpetersäure mit 100 ml dest. Wasser verdünnt und die MWCNT-Salpetersäure-Mischung zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde vorsichtig die klare Flüssigkeit dekantiert und erneut 100 ml dest. Wasser zugefügt. Es wurde wiederum zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis die MWCNT-Lösung neutral gewaschen war. Die neutral gewaschenen MWCNT wurden im Trockenschrank bei 100°C getrocknet und konnten anschließend direkt verwendet werden [Abraham, 2005, Goyanes et al., 2007].

2.3.6.3 Funktionalisierung mit konz. Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid

Es wurden 500 mg der Carbon Nanotubes in einem 250 ml-Rundkolben eingewogen und mit drei Siedesteinchen versetzt. Es wurden 40 ml konz. Schwefelsäure und 10 ml Wasserstoffperoxid 30% hinzugefügt und acht Stunden lang unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das CNT/Schwefelsäure/Wasserstoffperoxid-Gemisch mit 100 ml dest. Wasser verdünnt und zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abdekantiert und 100 ml dest. Wasser zugefügt. Es wurde wiederum zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Vorgang wurde wiederholt bis die MWCNT-Lösung neutral gewaschen war. Die neutral gewaschenen MWCNT wurden im Trockenschrank bei 100°C getrocknet und konnten anschließend direkt verwendet werden [Abraham 2005, Wei et al., 2002].

2.3.7 Herstellung der PLA-Probe

2.3.7.1 Lösung des PLAs

Ausgangsmaterialien für eine PLA-Probe sind bis zu vier verschiedene Einzelsubstanzen bzw. Lösungen. Zum einen das PLA, welches von verschiedenen Herstellern (Biomer, Boehringer-Ingelheim) und mit verschiedenen Mengen (50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg oder 150 mg) verwendet wurde (näheres siehe Kapitel 3). Dabei wurde das PLA mit 1 ml Dichlormethan versetzt und innerhalb von 30 min unter schütteln gelöst.

2.3.7.2 Herstellung einer leitfähigen Probe

Da das Enzym nach 1.9.5 von der Matrix eingehüllt ist, muss die Matrix Elektronen vom Enzym aufnehmen bzw. an das Enzym abgeben können

Weil PLA nicht leitfähig ist, muss ein leitfähiges Gemisch aus PLA und einer leitfähigen Substanz hergestellt werden. Dazu wurden die Substanzen Kupfer (als Pulver), Aktivkohle, nicht funktionalisierte Carbon Nanotubes und funktionalisierte Carbon Nanotubes verwendet. Die Herstellung erfolgt analog zu 2.3.7.1 Zusätzlich zum PLA wurden 25 mg der leitfähigen Substanz hinzugefügt und mit 1 ml Dichlormethan versetzt. Die Probe wurde für 30 min in den Schüttler gestellt, bis sich das ganze PLA gelöst hat und eine pastöse Masse entstanden ist.

2.3.7.3 Funktionalisierung mit einer Enzym-Lösung

Je nach Versuchsaufbau wurde der PLA-Probe eine Enzym-Lösung zugesetzt (Konzentration der Enzymlösung von 5 mg/ml bis zu 100 mg/ml). Dabei wurden verschiedene Volumina der hergestellten Enzym-Lösungen (wie in 2.3.5 beschrieben) der leitfähigen Proben (wie in 2.3.6.2 hergestellt) zugegeben. Die Proben wurden jeweils für 1 min im Vortexer gemischt. Die Proben wurden bei +4°C in einem Puffer gelagert.

2.3.7.4 Zugabe von Emulgatoren zu den PLA-Proben

Da sich die funktionalisierten PLA-Proben nach einer gewissen Zeit entmischten, wurde versucht, eine Verbesserung der Mischung mittels Emulgatoren zu erzielen. Dabei wurden den (wie in 2.3.7.3) hergestellten Proben zusätzlich verschiedene Mengen (5-50 mg Emulgator pro Probenansatz) an den Emulgatoren Span 40[®], Span 60[®], Span 65[®] und Tween 20[®] zugegeben.

2.3.8 Beschichtung der Makroelektroden mittels PLA-Emulsion

Da es sich bei den PLA-Proben um eine zähflüssige Masse handelte, wurden verschiedene Beschichtungsstrategien getestet.

Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur unter 25 °C an der Luft bzw. bei Raumtemperaturen über 25°C im Kühlschrank. Da das Dichlormethan abdampfte, musste darauf geachtet werden, dass das Abdampfen keine größere Blasenbildung auf der Elektrodenoberfläche zur Folge hatte. Falls sich Blasen gebildet hatten, wurde entweder die Beschichtung verworfen und eine neue Beschichtung aufgebracht oder, falls möglich, die Blasen, ohne die Beschichtung zu verletzen, zerstört.

2.3.8.1 Aufbringen der PLA-Emulsion mittels Spritze

Die gesamte PLA-Probe wird ohne Kanüle mittels einer Spritze aufgezogen. Da die Probe sehr viskos war, musste dies sehr langsam erfolgen. Danach wurde die Probe mittels Spritze auf die Makroelektrode gegeben bis die Elektrode komplett von der PLA-Proben-Paste bedeckt war. Die Elektrode wurde bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.8.2 Aufbringen der PLA-Emulsion mittels Dippen

Die Makroelektroden wurden nach 2.3.2 gereinigt und dann die Elektrodenoberfläche in die gesamte PLA-Probe (nach 2.3.7.3 hergestellt) getaucht. Nach 5 s wurde die Elektrode wieder aus der Probe entnommen und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.8.3 Aufbringen der PLA-Emulsion mittels Pipette

Die nun beschriebene Methode wurde als Standardmethode verwendet. Zum Aufbringen der Probe auf die Elektrode wurde eine 250 µl-Pipette mit variabel einstellbaren Volumen verwendet. Diese wurde auf 35 µl eingestellt. Mit einem Skalpell wurde der Einweg-Pipettenspitzen ein Teil der Spitze entfernt, so dass der Durchmesser der Pipettenspitze vergrößert wurde. Dies war nötig, da es sich bei den PLA-Emulsionen um zum Teil hochviskose Flüssigkeiten gehandelt hat. Die so aufgenommene Probe wurde auf die einzelnen Elektroden pipettiert. Wurde zu wenig Probe auf die zu beschichtende Elektrode pipettiert, wurde der Vorgang wiederholt. Die Probe wurde dann bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.9 Beschichtung von Dickschichtelektroden mittels PLA-Emulsion

Die Beschichtung der Dickschichtelektroden mit PLA-Emulsion erfolgte analog 2.3.8.3 mittels Pipette. Nach Aufgabe der PLA-Emulsion auf die Arbeitselektrode wurde die Emulsion bei Raumtemperatur getrocknet. Die so vorbereitete Elektrode wurde im Puffer bei +4°C gelagert.

2.3.10 Beschichtung von Elektroden mittels APTES und GDA

Auf die zu beschichtende Elektrode wurde 1 µl H₂O₂ –Lösung (1 %-ig) aufgegeben und für eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. 0,5 µl einer 1 %-igen APTES-Lösung wurden auf die so vorbereitete Elektrode pipettiert.

Zur Anbindung des Enzyms Laccase an aminofunktionalisierte Trägeroberfläche wurden die Proben mit einem Dialdehyd zur Reaktion gebracht. Die Beschichtung mit Glutardialdehyd erfolgte bei Raumtemperatur in einer 1%igen wässrigen Lösung (50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) für 4 Stunden [Nanci, A. et al. 1998].

Danach wurden die Sensoren dreimal jeweils mit 10 ml Phosphat-Puffer III abgespült und mit einer Lösung des Enzyms (35 µg/ml) in Phosphatpuffer III über Nacht inkubiert. Durch Eintauchen in die entsprechende Lösung wurde das Enzym an den freien Aldehydgruppen fixiert. Nach der Beschichtung wurde der Sensor mit dest. Wasser gespült und bei +4°C in Phosphat-Puffer III gelagert.

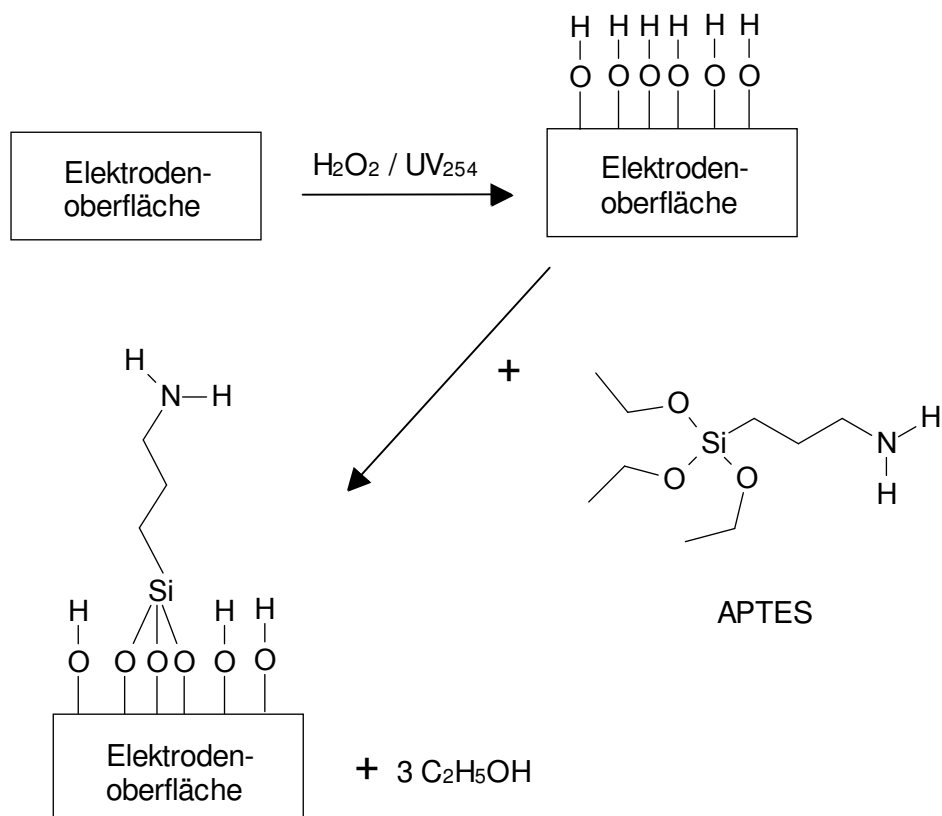


Abbildung 2.3.3 Schematische Darstellung der Amino-Silanisierung
Auf der aktivierten Oberfläche der Kohlenstoffelektroden wird durch 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) eine Aminooberfläche erzeugt

2.3.11 Beschichtung von Dickschichtelektroden mittels Photolinker

Es wurden die Photolinker Sulfo-HSAB und FNPA als Immobilisierungsreagenz für die Immobilisierung von Laccase auf den TFT-Sensoren getestet.

2.3.11.1 Beschichtung von Laccase mit Sulfo-HSAB

75 μl einer Sulfo-HSAB-Lösung (1 mg/0,1 ml) wurden mit 25 μl einer Laccase-Lösung (35 mg/ml) eine Stunde im Schüttler gemischt. Es wurden 0,5 μl der so hergestellten Lösung auf die Dickschichtelektroden aufgegeben. Es erfolgte eine einstündige Bestrahlung mit UV-Licht (Amalgam-Lampe). Danach wurde der Sensor mit dest. Wasser gespült und bei +4°C in Phosphat-Puffer III gelagert.

Die oben beschriebene Methode wurde zusätzlich in der Weise verändert, dass 3x jeweils 0,2 μl der oben hergestellten Sulfo-HSAB-/Laccase-Lösung auf die Arbeitselektrode des TFT-Sensors pipettiert wurden und der Sensor zwischendurch für 20 min mit UV-Licht bestrahlt

wurde. Der Sensor wurde mit dest. Wasser gespült und bei +4°C in Phosphat-Puffer III gelagert.

2.3.11.2 Beschichtung von Glucoseoxidase mit Sulfo-HSAB

75 µl einer Sulfo-HSAB-Lösung (1 mg/0,1 ml) wurden mit 25 µl einer Glucoseoxidase-Lösung (10 mg/ml; siehe 2.3.4.5) eine Stunde im Schüttler gemischt. Es wurden 0,5 µl der so hergestellten Lösung auf die Dickschichtelektroden aufgegeben. Es erfolgte eine einstündige Bestrahlung mit UV-Licht (Amalgam-Lampe). Danach wurde der Sensor mit dest. Wasser gespült und bei +4°C in Phosphat-Puffer III gelagert.

2.3.11.3 Beschichtung von Laccase mit FNPA

Die Arbeitselektroden der TFT-Sensoren wurden entweder mit 1 x 1 µl, 2 x 0,5 µl oder 4 x 0,25 µl einer FNPA-Lösung (1 mg/0,1ml) beschichtet. Dabei wurde bei der Aufgabe in mehreren Schritten darauf geachtet, dass die Arbeitselektrode jeweils trocken war. Danach wurden die Sensoren eine Stunde lang mit UV-Licht bestrahlt. Nach der Bestrahlung der Sensoren, wurden 0,5 µl einer Laccase-Enzymlösung (35 mg/ml) auf die Arbeitselektrode aufgegeben und die Dickschichtelektrode bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen wurde der TFT-Sensor mit dest. Wasser gespült und bei +4°C im Phosphat-Puffer III gelagert.

2.3.11.4 Beschichtung von Glucoseoxidase mit FNPA

Die Beschichtung der Arbeitselektroden der TFT-Sensoren mit FNPA erfolgte analog zu 2.3.11.3.

Nach der Bestrahlung der Sensoren wurde 0,5 µl einer Glucoseoxidase-Lösung (10 mg/ml) auf die Probe gegeben, der Sensor bei Raumtemperatur getrocknet, mit dest. Wasser gespült und bei +4°C im Phosphat-Puffer III gelagert.

2.3.12 Überprüfung der Immobilisierung auf Kartuschen mittels TMB

Zur Prüfung, ob HRP auf einer NHS-HiTrap[®]-Kartusche immobilisiert werden konnte, wurde eine spektroskopische Methode mit Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Diese Methode ist aufgrund der geringen Toxizität des TMBs (TMB ist weder mutagen noch cancerogen [Bos, E.S. et al. 1981]) anderen Möglichkeiten der Bestimmung von gebunden HRP vorzuziehen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die Peroxidase TMB unter Abbau von H-

H_2O_2 oxidiert. Die oxidierte Form des TMBs absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm).

Es wurde wie folgt eine Substratlösung hergestellt:

14,820 ml Acetat-Citrat-Puffer 100 mM, pH 4,9

0,150 ml TMB-Stammlösung (10 mg TMB/ml Dimethylsulfoxid (DMSO))

0,030 ml H_2O_2 , 3%-ige Lösung

Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte wurden jeweils mit 210 μl der Substratlösung befüllt. Unter Lichtausschluss wurde bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Danach wurden 40 μl einer 8 % H_2SO_4 -Lösung hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden.

Die Absorptionen der einzelnen Kavitäten wurden mittels eines Mikrotiterplattenreaders gemessen. Für eine quantitative Aussage kann die zugehörige Menge an HRP mittels einer Kalibriergeraden bestimmt werden [Josephy, P.D. et al. 1982, Welinder, K.G. 1976].

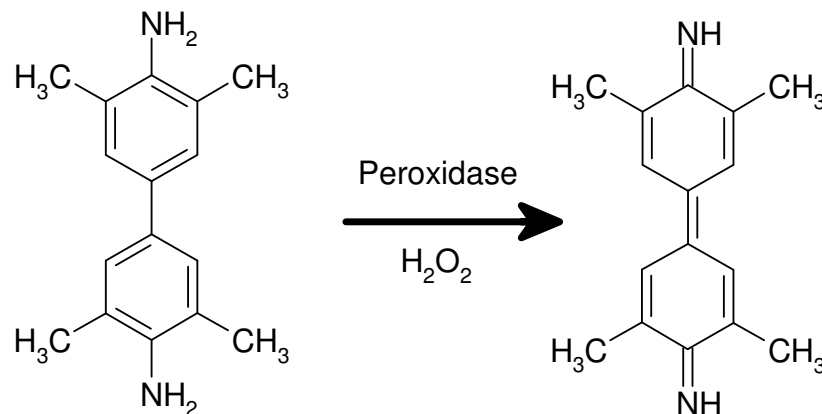


Abbildung 2.3.4 Reaktion von TMB (links) mit Peroxidase

2.3.13 Überprüfung der Immobilisierung von Laccase mittels ABTS

Die erfolgreiche Immobilisierung von Laccase auf einer Oberfläche oder in einer Kartusche wurde spektroskopisch überprüft. Dabei wurde eine ABTS-Lösung eingesetzt. Die durch Laccase oxidierte Form des ABTS kann bei 420 nm vermessen werden (siehe Abbildung 2.3.5).

Für den Test wurden 200 μl Laccase-Lösung zu 790 μl Citratpuffer III bzw. Phosphat-Puffer III gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl einer 3 mM ABTS-Lösung gestartet. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion, je nach Enzymmenge, mit 200 μl 5 M NaCl-Lösung gestoppt.

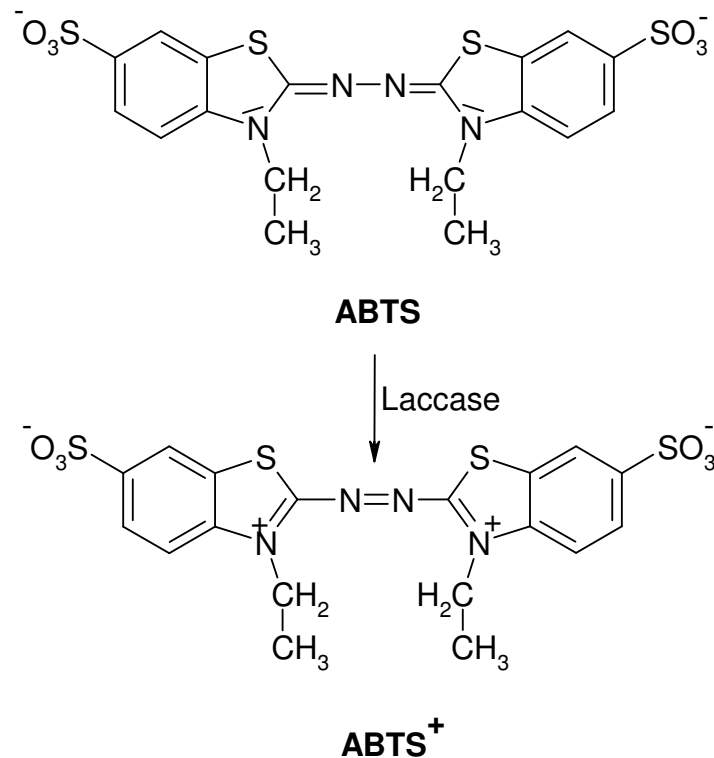


Abbildung 2.3.5 Reaktion von ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) mit Laccase
Das Oxidationsprodukt ist grün und hat ein Absorptionsmaximum bei 420 nm, bei dem das ABTS photometrisch vermessen werden kann.

2.3.14 Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu

Bei der Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu handelt es sich um eine spektroskopische Methode. Die Methode basiert auf Singleton und Rossi [Singleton und Rossi, 1965] und wurde von Ritter [Ritter, 1994] modifiziert. Proben mit einem hohen Gesamtphenolgehalt ($> 1\text{ g/l}$) wurden verdünnt.

8,4 ml demin. Wasser (beim Reagenzienblindwert 8,5 ml) wurden mit 0,1 ml der Probe versetzt. Es wurde 0,5 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzugefügt, gemischt und 5 min stehen gelassen. Dann wurde 1,0 ml gesättigte Natriumcarbonatlösung hinzugefügt. Nach 60 min Inkubation wurde die Absorption bei 720 nm in 1 cm Küvetten gegen den Reagenzienblindwert vermessen. Als Standard wurde (-)-Epicatechin verwendet, so dass sich die Ergebnisse immer auf Epicatechin-Äquivalente beziehen.

2.3.15 Herstellung von Realproben

Während der Aroniasaft wie auch der Cranberrysaft nicht behandelt worden sind, sondern nur zum Messen verdünnt worden sind, mussten die wässrigen Auszüge der Tees hergestellt

werden. Dabei wurde die Vorschrift auf den jeweiligen Teepackungen mit bestimmten Abwandlungen befolgt.

2.3.15.1 Teeproben

Laut der Vorschrift auf der Verpackung der Tees sollen 12 g getrocknete Teeblätter für 1 l Wasser verwendet werden. Dazu verwendet man 90° C heißes, weiches Wasser, hier demin. Wasser. Im Gegensatz zu der Packungsangabe wurde die Zeit zum Ziehen des Tees auf 5 min erhöht. Danach wurde der Tee über einen Faltenfilter filtriert und in Flaschen überführt. Der Tee wurde bis zur Messung bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Tests mit der Wall-Jet Zelle

3.1.1 Messungen von Polyphenolen ohne Enzym

Um die Auswirkungen der Veränderung verschiedener Parameter, z.B. die Wahl der Arbeitselektrode im Messaufbau oder Veränderungen von Potentialen am amperometrischen System beobachten zu können, jedoch ohne Einflüsse der biologischen Komponente berücksichtigen zu müssen, wurde in der ersten Phase der Versuche keine biologische Komponente eingesetzt. In der Literatur sind für Polyphenole Redoxpotential zwischen 0,600 V und 1,000 V angegeben. Der Versuchsaufbau erfolgte nach 2.2.1. Es wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gearbeitet. Die Laufzeit einer Messung betrug zwischen 2,5 min und 5 min. Vor der ersten Messung bzw. nach Veränderung des Messsystems wurde 30 min gewartet, bis die Drift des Signals nahezu konstant bei null lag.

3.1.1.1 Amperometrie mit verschiedenen Potentialen und Arbeitselektroden

Da für das amperometrische System zwei verschiedene Arbeitselektroden (Platin und Glassy Carbon) zur Verfügung standen, wurden beide Elektroden auf die elektrochemischen Reaktionen gegenüber Polyphenolen getestet. Dabei wurden jeweils eine 0,1 mM und eine 1 mM Probelösung der Substanzen p-Benzochinon, Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen (unter Verwendung eines 0,0667 M Phosphat-Puffers, pH 7,0) hergestellt und mit den beiden Elektroden vermessen. Die Substanz p-Benzochinon wurde neben den Diphenolen Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen vermessen, da es sich hierbei um das Produkt der enzymatischen Umsetzung von Hydrochinon handelt. Es wurde bei den Potentialen 600 mV, 700 mV und 800 mV gemessen, da je nach Literaturangabe das Redoxpotential von Polyphenolen zwischen 600 mV und 800 mV liegt.

Die Bestimmung der Ergebnisse erfolgte durch die Auswertung der Fläche des Signals.

Vergleicht man die Messungen zwischen der Glassy-Carbon Elektrode mit den Messungen der Pt-Elektrode, so erkennt man, dass die bei der Messung der GC-Elektrode erzeugten Signale deutlich größer sind (bis zu fünfmal größer), als die Signale, die durch Messungen mit der Pt-Elektrode erhalten wurden. Besonders deutlich wird dies bei den Messungen der 1 mM 1,2-Dihydroxybenzen-Lösung und der 1 mM Hydrochinon-Lösung. Aber auch wenn man die Messergebnisse der 0,1 mM Proben-Lösungen und der 1 mM Benzochinon-Lösung vergleicht

(siehe Abbildung 3.1.1), erkennt man, dass das Signal/Konzentrations-Verhältnis bei Verwendung der GC-Elektrode deutlich größer ist als bei Verwendung der Pt-Elektrode.

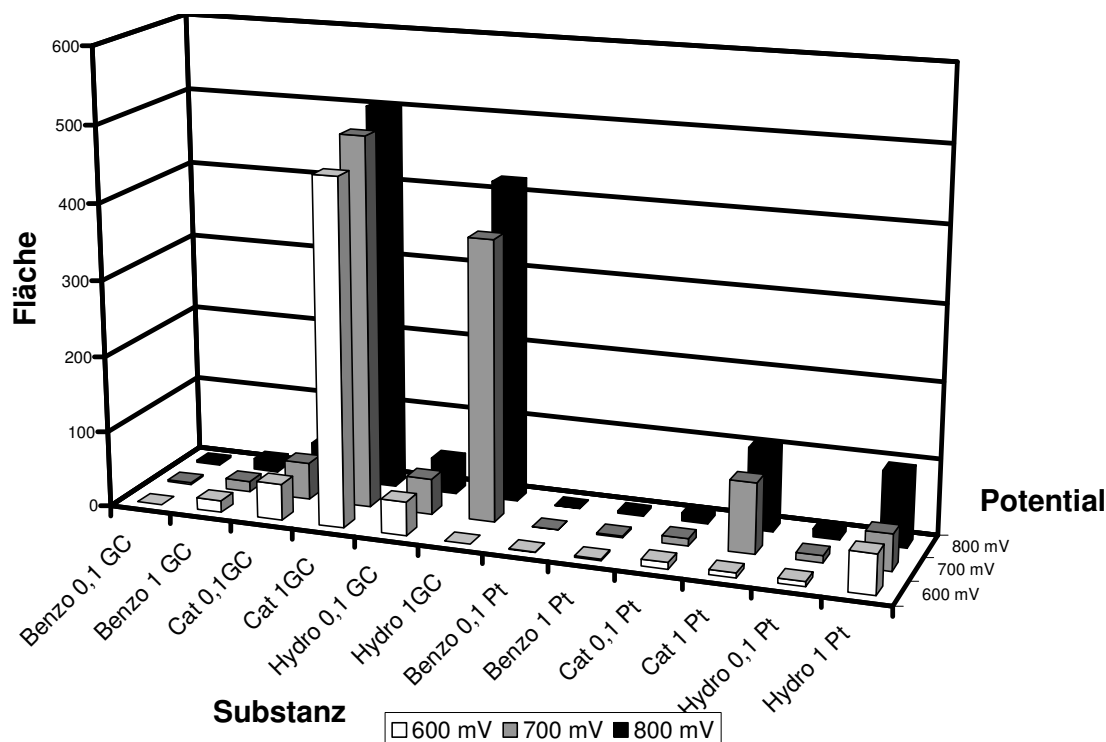


Abbildung 3.1.1 Vergleich von verschiedenen Elektroden bei verschiedenen Potentialen mit den Substanzen p-Benzochinon (Benzo), 1,2-Dihydroxybenzen (Cat) und Hydrochinon (Hydro); die Ziffern 0,1 und 1 geben die Konzentration der Lösung an: 0,1 = 0,1 mM; 1 = 1 mM, Pt = Platinelektrode ($\varnothing = 2$ mm) und GC = Glassy-Carbon-Elektrode ($\varnothing = 5$ mm)

3.1.1.2 Einfluss von verschiedenen Puffern

Da die Wahl des Puffers sowohl Auswirkungen auf die Leitfähigkeit der Messlösungen hat und damit ebenfalls Auswirkungen auf das amperometrische System hat, wie auch auf die Aktivität des Enzyms Laccase, wurden vier verschiedene Puffer-Systeme getestet. Bei allen Puffersystemen handelt es sich um Puffer, die bei der Verwendung des Enzyms Laccase genutzt werden (abhängig davon, aus welchem Organismus die Laccase extrahiert worden ist).

Es werden ein 0,0667 M Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert 7,0, ein 0,1 M Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 4,5, ein 0,05 M Acetat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 und ein 0,1 M Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 getestet.

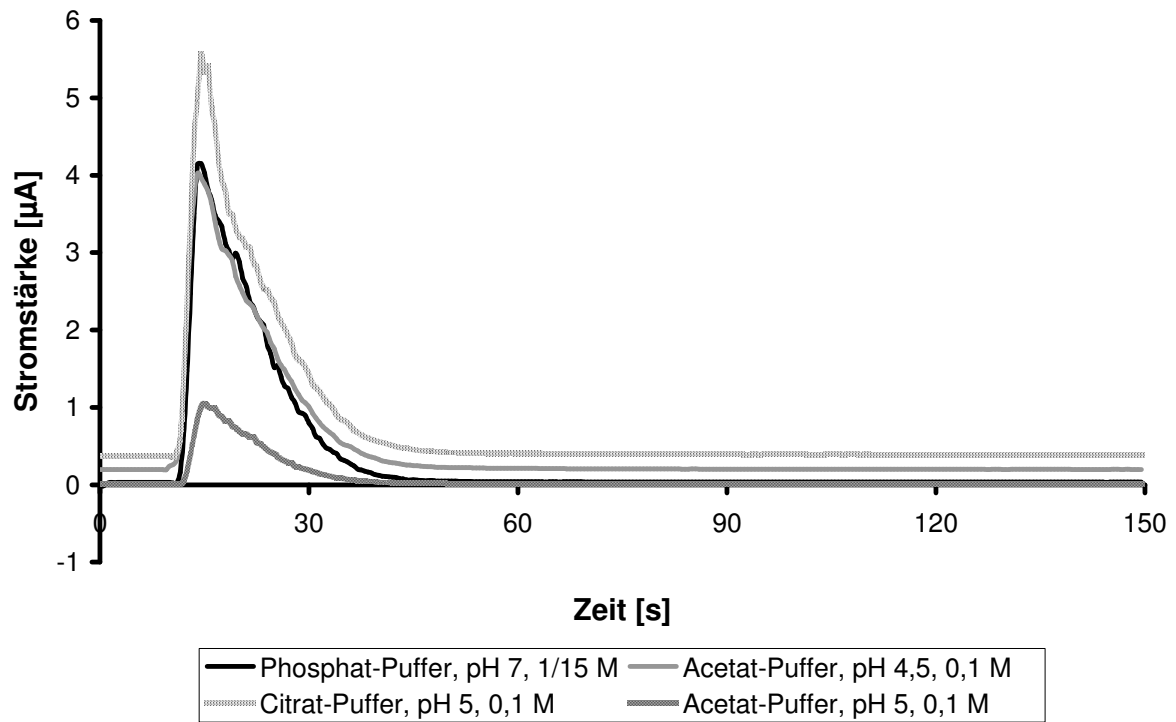


Abbildung 3.1.2 Lösungsmiteleinfluss auf die amperometrische Detektion von 1,2-Dihydroxybenzen
Arbeitselektrode: Glassy-Carbon; Potential: 800 mV;
Konzentration der Probelösung: 0,1 mM

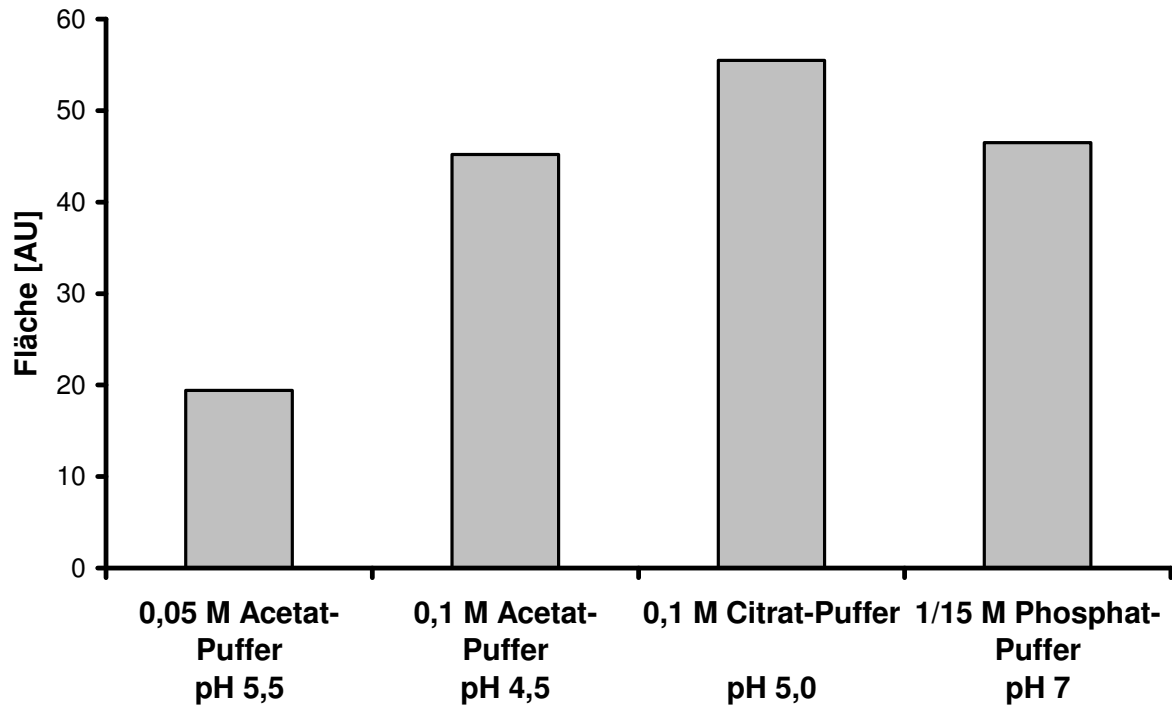


Abbildung 3.1.3 Vergleich der einzelnen Puffer auf das Ansprechverhalten des Detektors

In Abbildung 3.1.2 sind die Messungen dargestellt. Es wurde eine 0,1 mM 1,2-Dihydroxybenzen-Lösung bei einem Potential von 800 mV mit einer GC-Elektrode vermessen. Man erkennt, dass der Phosphat-Puffer im Gegensatz zu den anderen Puffern eine Basislinie nahe der Nulllinie aufweist. Den größten Grundstrom weist der 0,05 M Acetat-Puffer auf.

Vergleicht man nun die Flächen der einzelnen Peaks, wie in Abbildung 3.1.3 geschehen, so erkennt man, dass der Citrat-Puffer optimal für das Ansprechverhalten des Detektors ist. Der 0,05 M Acetat-Puffer bewirkt gegenüber den anderen Puffern ein geringeres Ansprechverhalten des Detektors. Der 0,1 M Acetat-Puffer und der Phosphat-Puffer sind nahezu identisch (Acetat-Puffer 45,3 Flächeneinheiten, Phosphat-Puffer 46,1 Flächeneinheiten).

3.1.1.3 Signal des Produktes bei der enzymatischen Reaktion

Bei der Reaktion von Hydrochinon mit Laccase entsteht p-Benzochinon. Um zu überprüfen, ob das Produkt der enzymatischen Reaktion im amperometrischen System eventuell stören kann bzw. die Messwerte verfälscht, wurde eine 1 mM p-Benzochinon-Lösung mit einer Glassy-Carbon-Arbeitslektrode vermessen bei einem Potential von -800 mV.

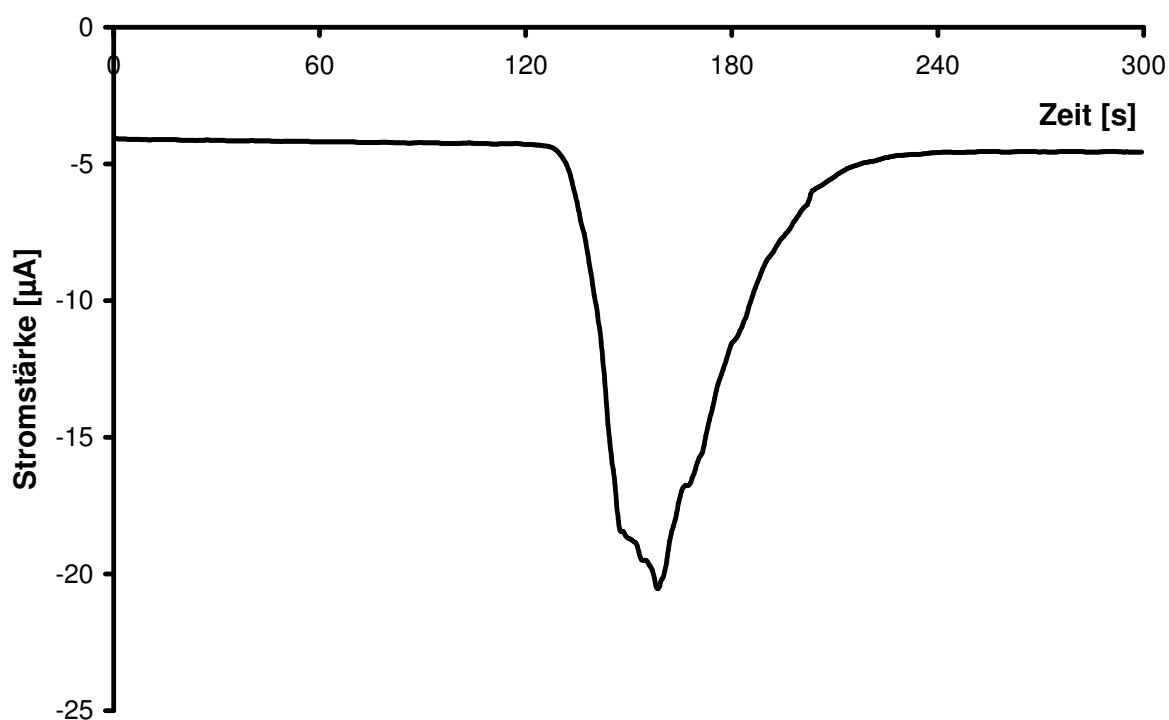


Abbildung 3.1.4 Strom/Zeit-Kurve von p-Benzochinon ($c = 1\text{mM}$)
Potential $E = -800\text{ mV}$; Puffer: Citrat-Puffer, pH 5,0, $c = 0,1\text{ M}$;

Es wurde ein Potential von -800 mV gewählt, da in diesem Fall p-Benzochinon an der Elektrode zu Hydrochinon reduziert werden sollte. Bei einem positiven Potential ist wie in Abbildung 3.1.1 dargestellt mit nur einem kleinen bzw. keinem Peak zu rechnen.

3.1.2 Versuche mit NHS-HiTrap®-Kartuschen

Zur Überprüfung der biologischen Komponente und deren Verhalten gegenüber verschiedenen Substraten wurde eine Enzymkartusche verwendet, in der das Enzym Laccase (EC 1.10.3.2) immobilisiert worden ist. Die Immobilisierung erfolgte nach 2.3.1. Die amperometrischen Messungen erfolgten mit einer GC-Arbeits Elektrode bei einem Potential von 800 mV soweit nicht anders angegeben. Die Laufzeiten der einzelnen Messungen betrugen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min fünf Minuten.

Dieses System dient als Vorläufermodell für den späteren Biosensor.

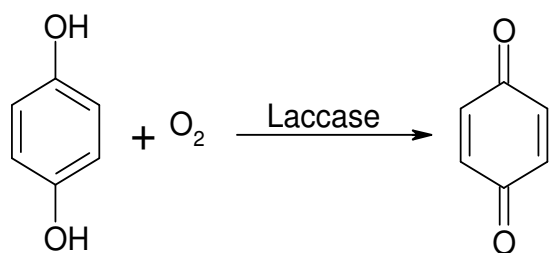
3.1.2.1 Überprüfung der Immobilisierung des Enzyms Laccase auf die Kartusche

Bevor eine Enzym-Kartusche verwendet wurde, wurde überprüft, ob die Immobilisierung der Laccase auf die NHS-HiTrap®-Säule erfolgreich war.

Dazu wurde in die Kartusche mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eine ABTS-Lösung injiziert. Es zeigte sich bei einer erfolgreichen Immobilisierung eine deutliche Grünfärbung der Kartusche, resultierend aus der Reaktion des ABTS mit Laccase (Reaktionsschema siehe Abbildung 2.3.6). Durch das Spülen mit Puffer konnte die Grünfärbung wieder aus der Kartusche ausgewaschen werden.

3.1.2.2 Messung von Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und p-Benzochinon

Die Messung von Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und p-Benzochinon wurde mit dem Systemaufbau nach 2.3.4 durchgeführt. Die mit Laccase beschichtete NHS-HiTrap®-Kartusche wurde zwischen Injektionsport und elektrochemischen Detektor eingebaut. Da Laccase Hydrochinon mit Hilfe von Sauerstoff zu p-Benzochinon oxidiert, wurde für die Messung der Hydrochinon-Lösung und der p-Benzochinon-Lösung dieselbe Peakgeometrie erwartet, was auch experimentell bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 3.1.6). Da sich 1,2-Dihydroxybenzen von Hydrochinon chemisch nur durch die Position der Hydroxygruppen unterscheidet (Hydrochinon: 1,4-Position; 1,2-Dihydroxybenzen 1,2-Position), wurde aufgrund der Substratspezifität des Enzyms Laccase bei Messungen von 1,2-Dihydroxybenzen bei selber Peakgeometrie ein niedrigeres Signal erwartet, als bei den Messungen von Hydrochinon, was das Experiment bestätigt.

**Abbildung 3.1.5**

Reaktion von Hydrochinon mit Sauerstoff durch das Enzym Laccase (1.10.3.2)

Ein Vergleich der Flächen der Elektropherogramme der einzelnen Substanzen bestätigt die Erwartungen (siehe Tabelle 7). Betrachtet man die relativen Standardabweichungen, so ist auffällig, dass die Flächen der mit dem Enzym Laccase umgesetzten Substanzen 1,2-Dihydroxybenzen und Hydrochinon eine höhere relative Standardabweichung aufweisen als das nicht vom Enzym umgesetzte p-Benzochinon.

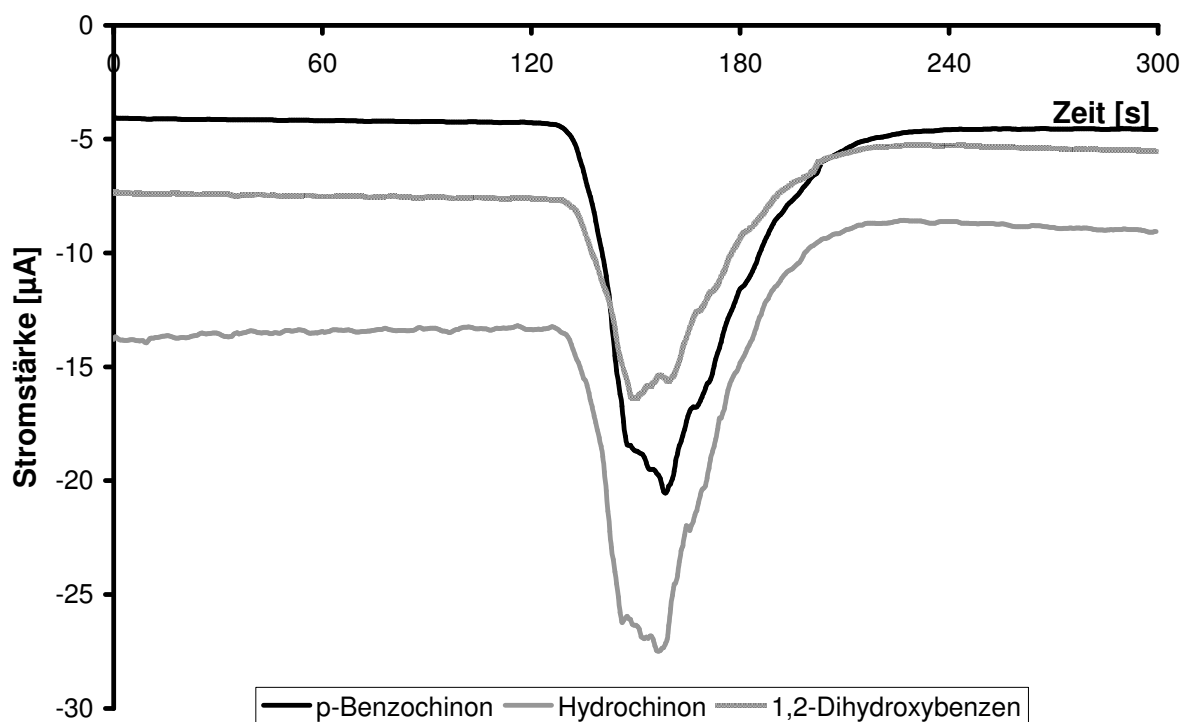


Abbildung 3.1.6 Messung von p-Benzochinon, Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen
Potential $E = -800 \text{ mV}$; Puffer: Citrat-Puffer pH 5, 0,1 M

Tabelle 7 Berechnete Flächen der Elektropherogramme der Substanzen p-Benzochinon, Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen bei einem Potential von $E = -800 \text{ mV}$. Als Puffer diente ein Citrat-Puffer 0,1 M mit einem pH-Wert von 5,0. Die Mittelwerte wurden aus drei Einzelwerten berechnet

Substanz	Flächen-Mittelwert	Standardabweichung	Relative Standardabweichung
p-Benzochinon	625,57	10,09	1,61 %
Hydrochinon	550,06	28,89	5,25 %
1,2-Dihydroxybenzen	334,20	21,29	6,35 %

Da bei einem Potential von -800 mV zum einen eventuelle Störsubstanzen mitoxidiert werden können und es, wie es in Abbildung 3.1.6 zu sehen ist, es keine „saubere“ Peakgeometrie gibt, wurde zugleich das Potential auf -50 mV reduziert. Bei diesem Potential sollten nur die zuvor durch Laccase oxidierten Polyphenole reduziert werden.

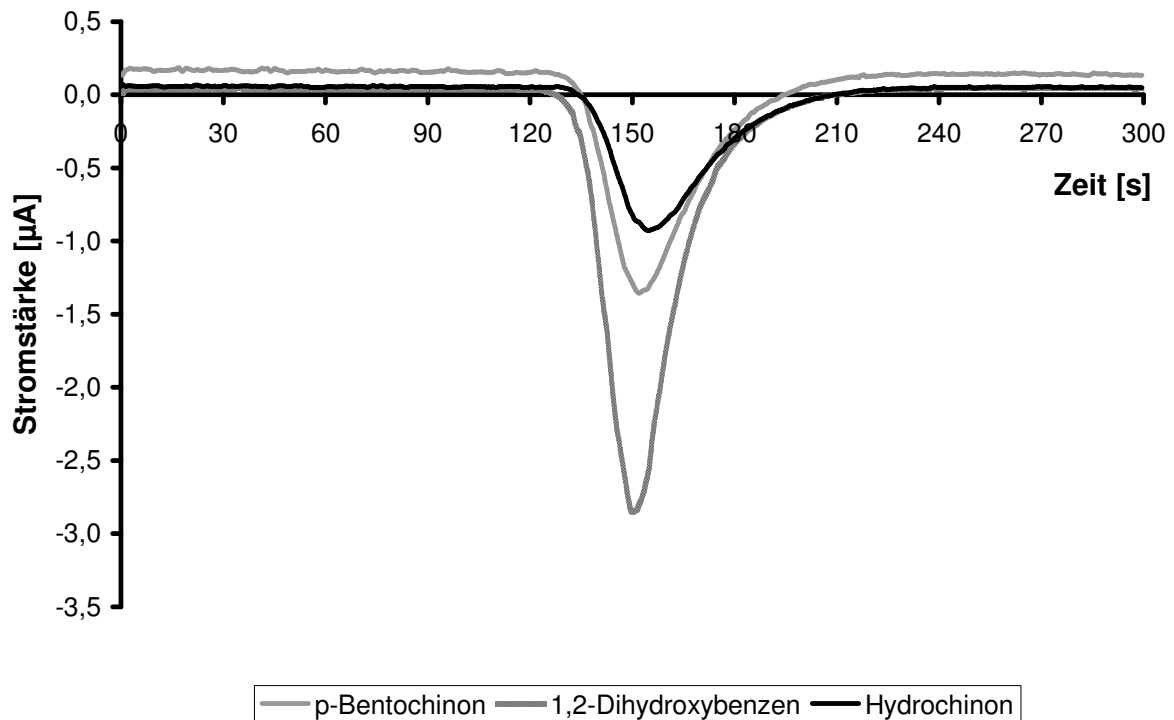


Abbildung 3.1.7 Messung von p-Benzochinon, Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen
Potential $E = -50$ mV; Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5

Wie man aus der Abbildung 3.1.7 erkennen kann, ergibt sich bei geringerem Potential eine saubere Peakgeometrie. Auffällig ist, dass bei gleicher Konzentration von p-Benzochinon, Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen, 1,2-Dihydroxybenzen im Gegensatz zu der vorherigen Messung, den größten Peak aufzeigt (siehe auch Tabelle 7). Während die Werte der Flächen bei einem Potential von -800 mV zwischen 300 (1,2-Dihydroxybenzen) und 625 (p-Benzochinon) liegen, so liegen nun die Flächenwerte zwischen 32 und 43. Dabei sind die Standardabweichung der Flächen der Elektropherogramme von 1,2-Dihydroxybenzen und von p-Benzochinon gegenüber der vorherigen Messungen bei -800 mV größer geworden, während die Standardabweichung der Flächen von Hydrochinon kleiner geworden ist.

Tabelle 8 Berechnete Flächen bei einem Potential von $E = -50$ mV. Als Puffer diente ein Citrat-Puffer 0,1 M mit einem pH-Wert von 5. Die Mittelwerte wurden aus drei Einzelwerten berechnet

Substanz	Flächen-Mittelwert	Standardabweichung	Relative Standardabweichung
p-Benzochinon	36,29	2,08	5,74 %
Hydrochinon	32,23	1,22	3,80 %
1,2-Dihydroxybenzen	43,75	8,35	19,09 %

3.1.2.3 Linearität des Messsystems

Um festzustellen, ob die Kombination aus Elektrode und Enzymkartusche als Vorläufermodell eines Biosensors eine quantitative Bestimmung zulässt, wurden die Substanzen Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und p-Benzochinon mit unterschiedlichen Konzentrationen mit einer GC-Arbeitselektrode vermessen.

Da die Signale bei -50 mV deutlich geringer ausfielen als bei -800 mV, jedoch bei -800 mV die Peaks keine akzeptable Peakgeometrie mehr aufwiesen, wurde bei den Potentialen -150 mV und -250 mV gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Potentiale wurden abgesenkt, um mit geringeren Probenkonzentrationen arbeiten zu können (0,25 mM, 05, mM und 0,75 mM) und so eine komplette Reaktion der Proben mit dem Enzym Laccase sicherstellen zu können.

3.1.2.3.1 Messungen bei dem Potential $E = -150$ mV

In Abbildung 3.1.8 sind die Messergebnisse von p-Benzochinon und Hydrochinon dargestellt, sowie die Kalibriergerade für Hydrochinon mit dem zugehörigen Korrelationskoeffizienten. Es wurde eine Doppelbestimmung der einzelnen Werte durchgeführt. Wie erwartet, erkennt man deutlich die Korrelation zwischen Hydrochinon, das durch die Laccase zu p-Benzochinon umgewandelt worden ist, und dem direkt vermessenen p-Benzochinon. Jedoch erhält man bei der Vermessung der 0,75 mM Hydrochinon-Lösung eine Standardabweichung von 18,12%. Dies stellt die größte Abweichung aller Messungen bei einem Potential von -150 mV dar.

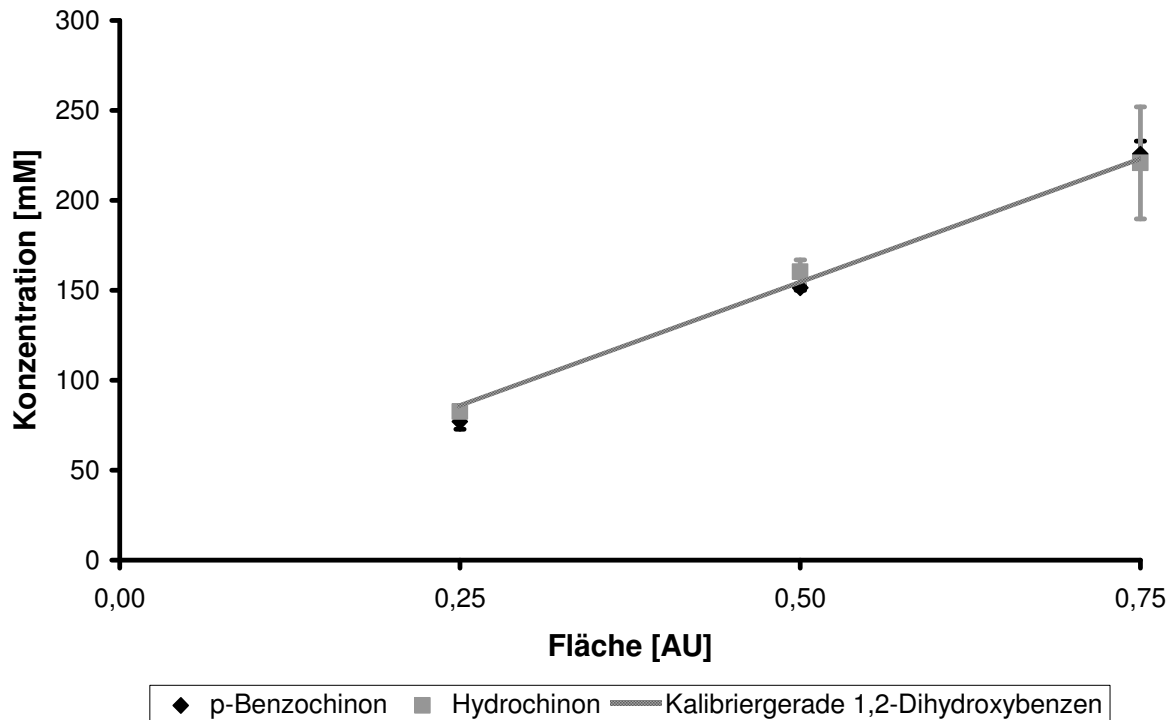


Abbildung 3.1.8 Dreipunktkalibrierung von Hydrochinon und p-Benzochinon
Potential von E = -150 mV; Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5

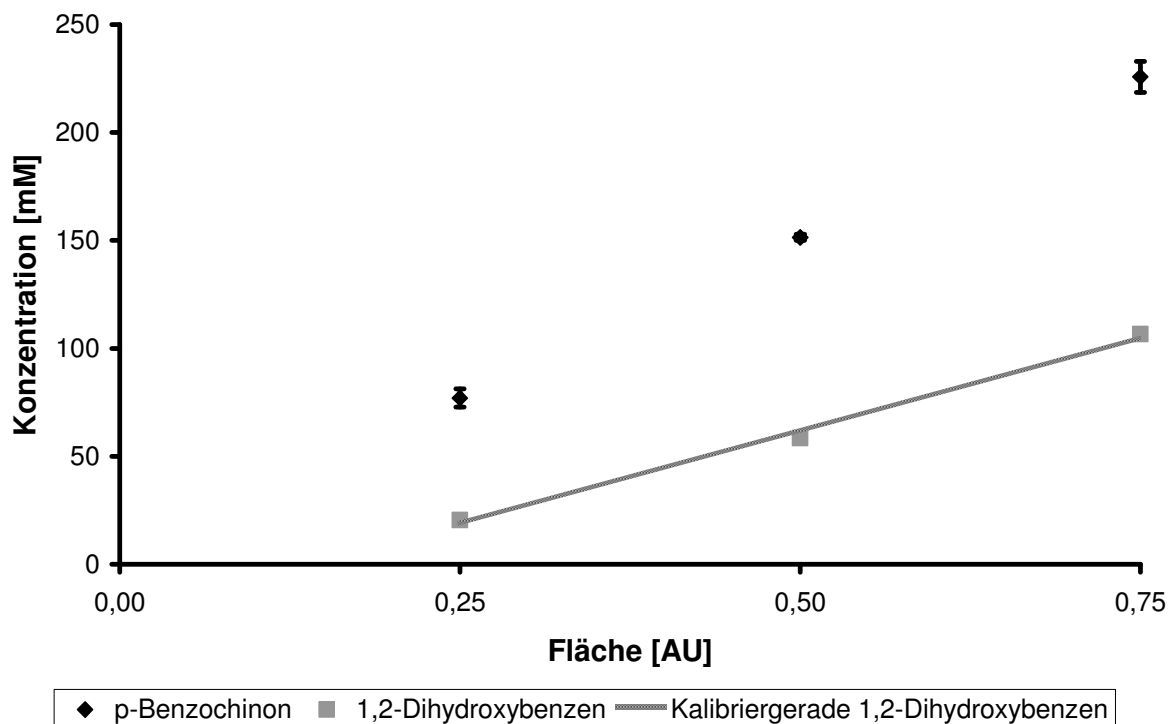


Abbildung 3.1.9 Dreipunktkalibrierung von p-Benzochinon und 1,2-Dihydroxybenzen
Potential von E = -150 mV; Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5

Vergleicht man die Messungen von p-Benzochinon und 1,2-Dihydroxybenzen in Abbildung 3.1.9, so kann man eine Abweichung der 1,2-Dihydroxybenzen-Messungen im Bezug zur p-Benzochinon-Messungen sowohl in der Signalintensität, wie auch in der Steigung der

Geraden erkennen. Dies bedeutet, dass das Messsystem empfindlicher auf p-Benzochinon reagiert. Ursache für die unterschiedliche Empfindlichkeit kann die Substratspezifität des Enzyms sein, welches auf Hydrochinon empfindlicher reagiert als auf 1,2-Dihydroxybenzen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Unterschiedlichkeit der Redoxpotential von p-Benzochinon und das durch das Enzym gebildete o-Benzochinon.

Vergleicht man die relativen Standardabweichungen der einzelnen Ergebnisse miteinander (Tabelle 9), so erkennt man, dass sowohl bei p-Benzochinon wie auch bei 1,2-Dihydroxybenzen der kleinste Messwert die höchste Standardabweichung hat. Im Gegensatz dazu steigt mit zunehmender Konzentration bei Hydrochinon die Standardabweichung.

Tabelle 9 Vergleich der relativen Standardabweichungen bei Messungen mit einem Potential von -150 mV

Konzentration [mM]	relative Standardabweichung (-150 mV)		
	p-Benzochinon	Hydrochinon	1,2-Dihydroxybenzen
0,25	7,46%	1,29%	8,10%
0,50	1,33%	5,69%	3,56%
0,75	4,39%	18,12%	0,93%

Bei den Kalibriergeraden weisen neben der Steigung auch die y-Achsenabschnitte Unterschiede auf. Während die y-Achsenabschnitte der p-Benzochinon-Kalibriergeraden und der Hydrochinon-Kalibriergeraden positiv sind, ist der y-Achsenabschnitt der 1,2-Dihydroxybenzen-Kalibriergeraden negativ.

Tabelle 10 Vergleich der Kalibriergeradenfunktionen und Korrelationskoeffizienten bei Messungen mit einem Potential von -150 mV

Substanz	Funktion der Kalibriergeraden	Korrelationskoeffizient
p-Benzochinon	$y = 297,57 x + 2,62$	1,0000
Hydrochinon	$y = 276,43 x + 16,37$	0,9974
1,2-Dihydroxybenzen	$y = 172,38 x - 24,31$	0,9976

3.1.2.3.2 Messungen bei dem Potential $E = -250 \text{ mV}$

Die Ergebnisse der Messungen bei dem Potential von -250 mV kann man aus Abbildung 3.1.10 und 3.1.11 entnehmen. Es ist deutlich zu sehen, dass diesmal die Messpunkte für Hydrochinon und p-Benzochinon nicht zusammen liegen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen

bei Messungen mit einem Potential von -150 mV erhält man bei den Messungen mit einem Potential von -250 mV ein besseres Signal-Konzentrationsverhältnis für Hydrochinon.

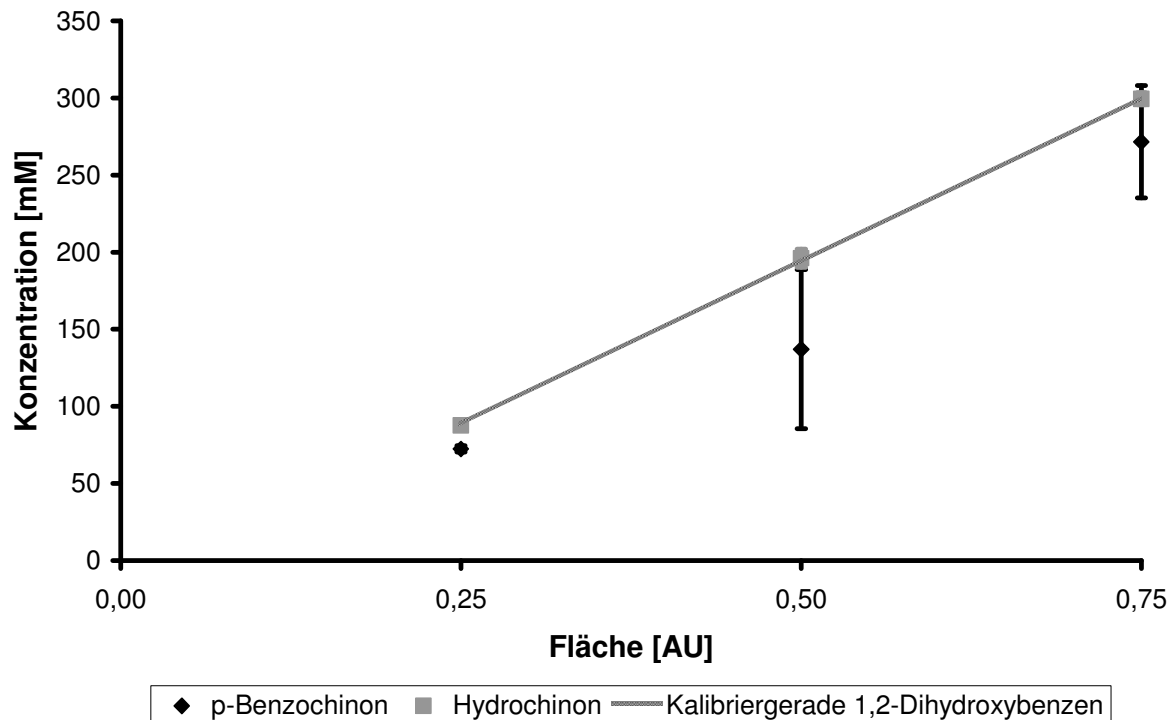


Abbildung 3.1.10 Dreipunktkalibrierung von p-Benzochinon und Hydrochinon
Potential von $E = -250$ mV; Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5

Stellt man nun die Messungen von 1,2-Dihydroxybenzen und p-Benzochinon bei einem Potential von -250 mV gegenüber, so ist auch hier die geringere Signalintensität der vermessenen 1,2-Dihydroxybenzen-Proben wie bei den Messungen bei einem Potential von -150 mV sichtbar (siehe 3.1.11).

Bei einem Vergleich der relativen Standardabweichungen sind die deutlich höheren Abweichungen bei p-Benzochinon und 1,2-Dihydroxybenzen auffällig. Der Wert der kleinsten Konzentration der 1,2-Dihydroxybenzen-Probe weist sogar eine Abweichung von fast 60% auf. Im Gegensatz dazu hat bei den p-Benzochinon-Proben die mittlere Konzentration mit 42% die höchste Abweichung. Dem gegenüber stehen relativ geringe Standardabweichungen bei Hydrochinon.

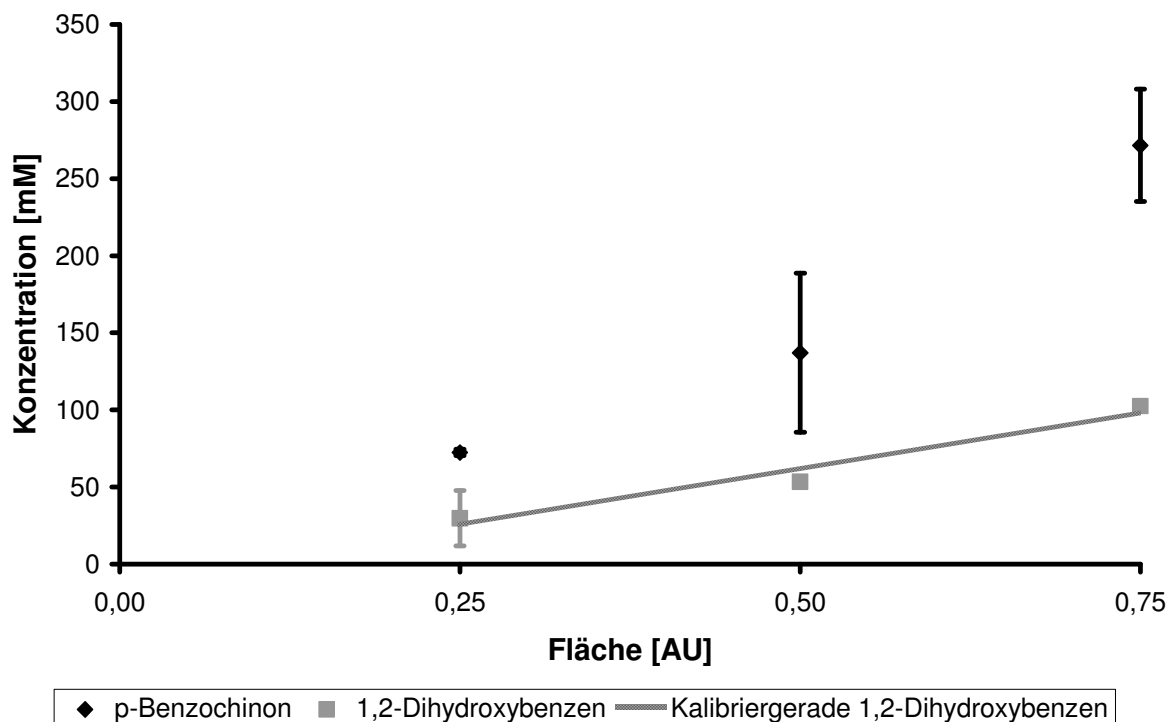


Abbildung 3.1.11 Dreipunktkalibrierung von p-Benzoquinon und 1,2-Dihydroxybenzenen
Potential von $E = -250$ mV; Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5

Tabelle 11 Vergleich der relativen Standardabweichungen bei Messungen mit einem Potential von -250 mV

Konzentration [mM]	relative Standardabweichung (-250 mV)		
	p-Benzoquinon	Hydrochinon	1,2-Dihydroxybenzen
0,25	3,97%	0,14%	59,66%
0,50	42,05%	4,22%	0,53%
0,75	17,32%	1,83%	3,27%

Die hohen Standardabweichungen spiegeln sich auch in den Korrelationskoeffizienten wider. Während der Korrelationskoeffizient für die Hydrochinon-Messungen mit 0,9999 sehr gut ist, ist der Korrelationskoeffizient für die p-Benzoquinon- und 1,2-Dihydroxybenzen-Messungen mit je 0,9802 gering.

Tabelle 12 Vergleich der Kalibriergeradenfunktionen und Korrelationskoeffizienten bei Messungen mit einem Potential von -250 mV

Substanz	Funktion der Kalibriergeraden	Korrelationskoeffizient
p-Benzoquinon	$y = 398,53 x - 17,61$	0,9802
Hydrochinon	$y = 424,02 x - 38,94$	0,9999
1,2-Dihydroxybenzen	$y = 145,26 x - 10,76$	0,9802

3.1.2.3.3 Vergleich der Messergebnisse bei unterschiedlichen Potentialen

Um eine Aussage darüber zu erhalten, bei welchem Potential die nachfolgenden Messungen durchgeführt werden sollen, werden die in 3.1.2.3.1 und 3.1.2.3.2 ermittelten Ergebnisse miteinander verglichen.

Es erfolgt der Vergleich der Standardabweichungen, der Korrelationskoeffizienten und der Signal-/Konzentrationsverhältnisse bzw. der Empfindlichkeiten.

Die Standardabweichungen der Messungen bei einem Potential von -250 mV liegen, mit Ausnahme von Hydrochinon, deutlich höher. Auffällig sind aber die Standardabweichungen von Hydrochinon für die Konzentrationen 0,25 mM und 0,5 mM bei den Messungen bei einem Potential von -150 mV, die den Standardabweichungen ähnlich denen der Messungen bei einem Potential von -250 mV sind.

Bei den Messungen mit dem kleineren Potential sind die Korrelationskoeffizienten deutlich besser als bei den Messungen mit dem größeren Potential. So ist der Korrelationskoeffizient für p-Benzochinon 1,0000, was darauf schließen lässt, dass das elektrochemische System optimal eingestellt ist.

Untersucht man nun noch die Veränderung der Empfindlichkeiten bei den verschiedenen Potentialen (Vergleich der einzelnen Steigungen der Kalibriergeraden, siehe Tabelle 13), so erkennt man, dass die Unterschiede in der Empfindlichkeit teilweise sehr groß sind. Während bei p-Benzochinon und Hydrochinon bei Vergrößerung des absoluten Potentials die Steigung der Kalibriergerade ebenfalls größer wird, so ist bei der Testsubstanz 1,2-Dihydroxybenzen genau das Gegenteil der Fall.

Tabelle 13 Vergleich der einzelnen Steigungen der Kalibriergeraden

Potential	p-Benzochinon	Hydrochinon	1,2-Dihydroxybenzen
-150 mV	297,5694918	276,42725	172,38352
-250 mV	398,5313744	424,01571	145,26239

Aufgrund der besseren Korrelationskoeffizienten, der geringeren Standardabweichungen und der Verbesserung der Empfindlichkeit des 1,2-Dihydroxybensens bei niedrigerem Potential, wird in den folgenden Versuchen ein Potential von -150 mV an die Elektroden angelegt.

3.1.2.4 Amperometrische Messungen

Es wurden die Substanzen Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen, Gallussäure, Kaffeesäure und DL-DOPA vermessen. Diese Substanzen wurden gewählt, da sie als Beispiele für

Substanzklasse verwendet werden können. Dabei wurde Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen für die Substanzklasse der Diphenole verwendet, Gallussäure für die Substanzklasse der Benzoessäurederivate, Kaffeesäure für die Substanzklasse der Zimtsäurederivate und DL-DOPA für die Substanzklasse der Aminosäuren. Allen gemein ist, dass die Substanzen jeweils mindestens zwei Hydroxygruppen aufweisen. Um eine statistisch relevante Aussage machen zu können, wurden die einzelnen Konzentrationen jeweils dreifach bestimmt. Des Weiteren wurden mindestens Fünf-Punkt-Kalibrierungen durchgeführt.

Aus den in 3.1.2.3. ermittelten Daten ergibt sich, dass die Versuche mit einem Potential von $E = -150 \text{ mV}$ vorgenommen wurden. Dabei wurde eine GC-Arbeits Elektrode verwendet. Alle Substanzen sind in Citrat-Puffer, der auch als Fließmittel dient, gelöst worden.

3.1.2.5 Amperometrische Messung von Hydrochinon

In Abbildung 3.1.12 ist die Messreihe für Hydrochinon abgebildet. Es handelt sich hierbei um eine Sechs-Punkt-Kalibrierung. Wie man erkennen kann, gibt es einen linearen Zusammenhang in einem Konzentrationsbereich von 0,05 mM bis 1,00 mM. Dies spiegelt sich auch in dem Korrelationskoeffizienten von 0,9990 wieder (siehe Abbildung 3.1.13). Man erreicht bei einer Konzentration von 1,00 mM jedoch ein Plateau, bei dem keine lineare Abhängigkeit zwischen Fläche und Konzentration mehr gegeben ist. Die Nachweisgrenze für Hydrochinon beträgt 0,062 mM, die Bestimmungsgrenze beträgt 0,199 mM (berechnet nach DIN 32645).

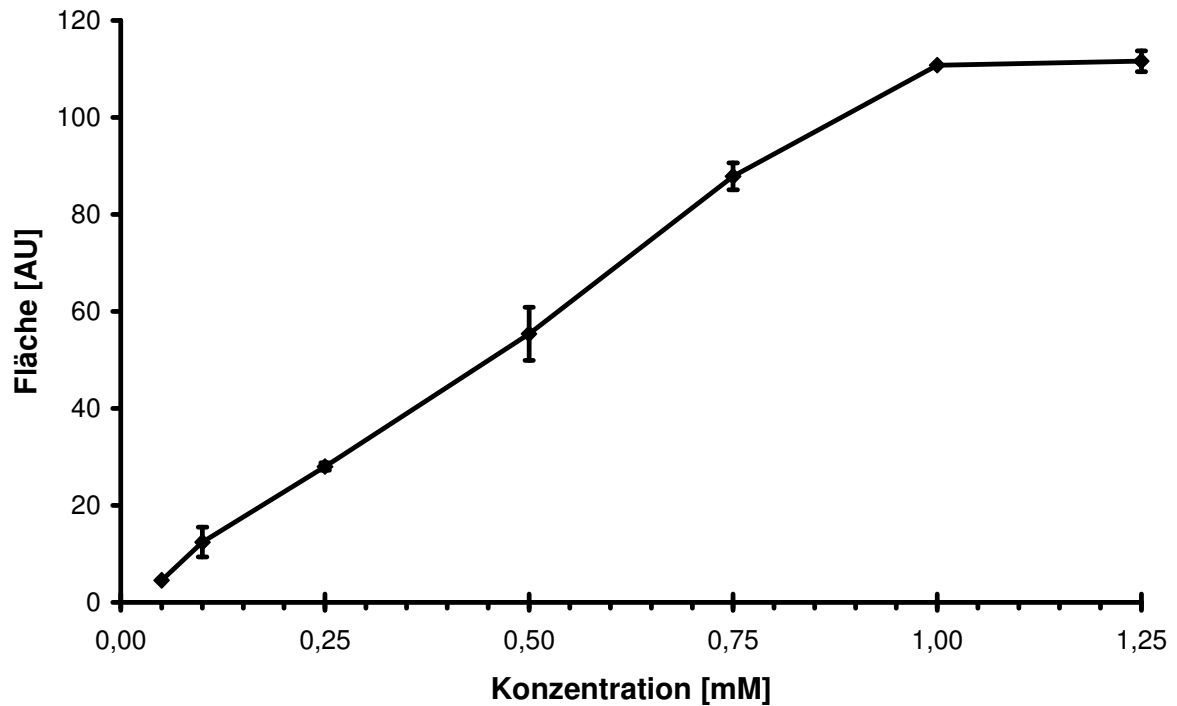


Abbildung 3.1.12 Messreihe von Hydrochinon bei einem Potential von $E = -150$ mV
Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen:
0,05 mM; 0,10 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 0,75 mM; 1,00 mM und 1,25 mM

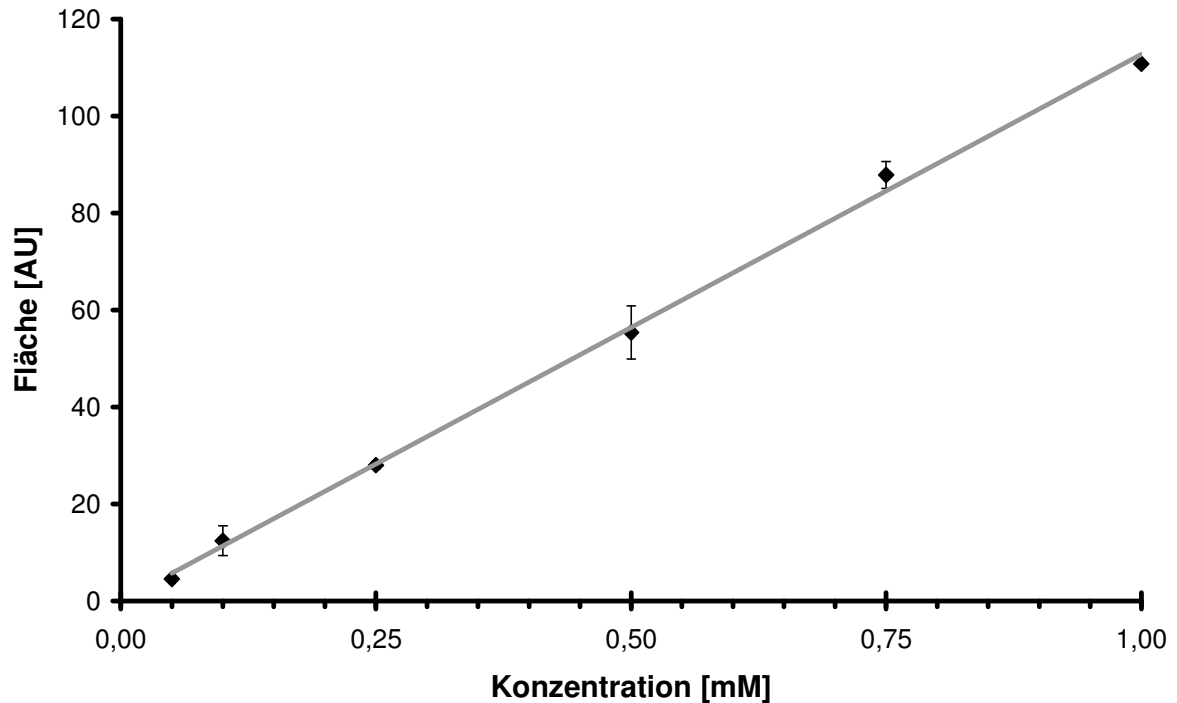


Abbildung 3.1.13 Kalibriergerade von Hydrochinon bei einem Potential von $E = -150$ mV
Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen:
0,05 mM; 0,10 mM; 0,25 mM; 0,50 mM; 0,75 mM und 1,00 mM

3.1.2.6 Amperometrische Messung von 1,2-Dihydroxybenzen

In der Messreihe mit dem Substrat 1,2-Dihydroxybenzen gibt es zwei Auffälligkeiten (siehe Abbildung 3.1.14). Zum einen ist die Standardabweichung sehr gering. Zum anderen scheint es in dem Bereich zwischen 0,05 mM und 0,75 mM einen sigmoiden Verlauf der Kalibrierfunktion zu geben. Jedoch entsprechen die Konzentrationen zwischen 0,75 mM und 1,25 mM nicht dem erwartenden Verlauf einer sigmoiden Kurve. Die Nachweisgrenze beträgt 0,139 mM und die Bestimmungsgrenze beträgt 0,414 mM. Vergleicht man die Steigung der Regressionsgeraden und damit die Empfindlichkeit, so erkennt man, dass wider erwarten das System auf 1,2-Dihydroxybenzen empfindlicher reagiert als auf Hydrochinon.

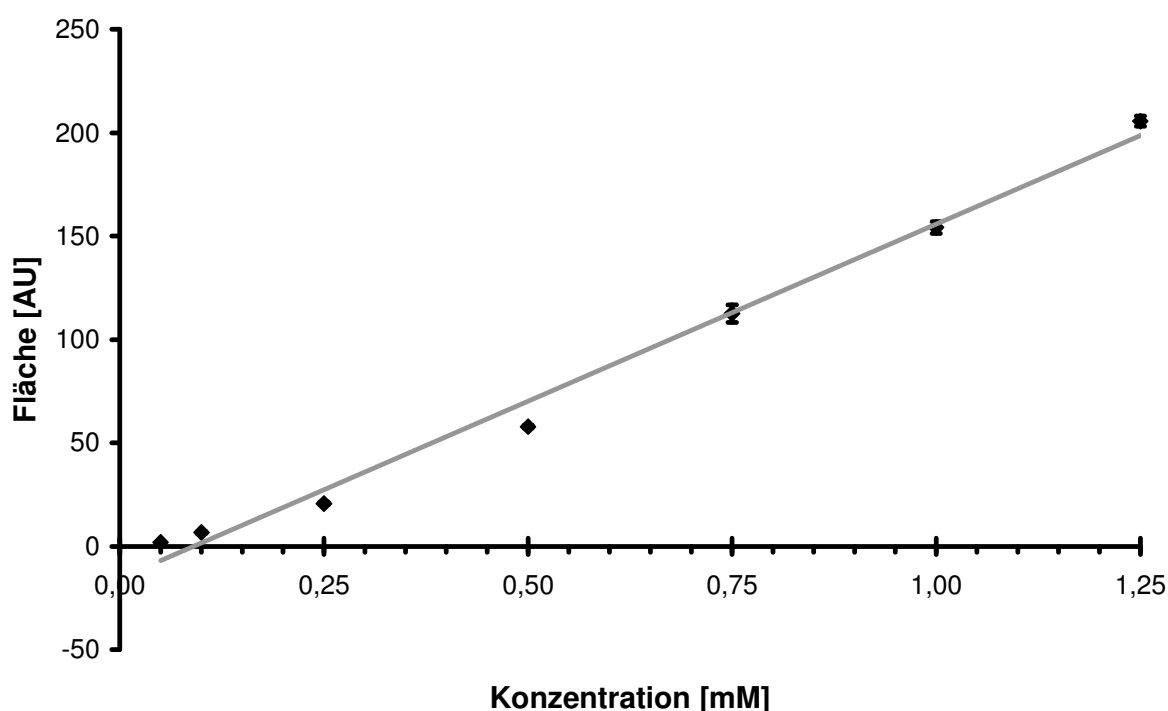


Abbildung 3.1.14 Sieben-Punkt-Kalibriergerade von 1,2-Dihydroxybenzen bei einem Potential $E = -150$ mV. Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen: 0,05 mM, 0,10 mM, 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM und 1,25 mM; Dreifachbestimmung der einzelnen Messpunkte

3.1.2.7 Amperometrische Messung von Gallussäure

Für die Substanz Gallussäure wurden Bestimmungen im Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 2,5 mM vorgenommen (Abbildung 3.1.15), da im Konzentrationsbereich unter 0,5 mM kein Signal im Elektropherogramm mehr zu erkennen ist. Obwohl die Kurve im unteren Konzentrationsbereich abflacht, erhält man einen Korrelationskoeffizient von 0,9921. Dies spiegelt auch die Regressionsgerade wieder, die im Gegensatz zur 1,2-Dihydroxybenzen-Regressionsgeraden durch alle Punkte der Kalibrierkurve geht. Auffällig im Vergleich zu 1,2-

Dihydroxybenzen und Hydrochinon ist, dass bei selber Konzentration die daraus resultierende Fläche bei Gallussäure deutlich kleiner ist. Da es sich bei Gallussäure um eine Trihydroxybenzoesäure im Vergleich zu den Dihydroxyphenyl-Derivaten 1,2-Dihydroxybenzen und Hydrochinon handelt ist dies aber mit der Substratspezifität des Enzyms Laccase zu erklären. Daraus resultieren auch die deutlich höhere Nachweisgrenze von 0,455 mM und die Bestimmungsgrenze von 1,265 mM. Neben der hohen Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze fällt vor allem die geringe Empfindlichkeit auf. Sie ist die geringste im Vergleich aller Testsubstanzen.

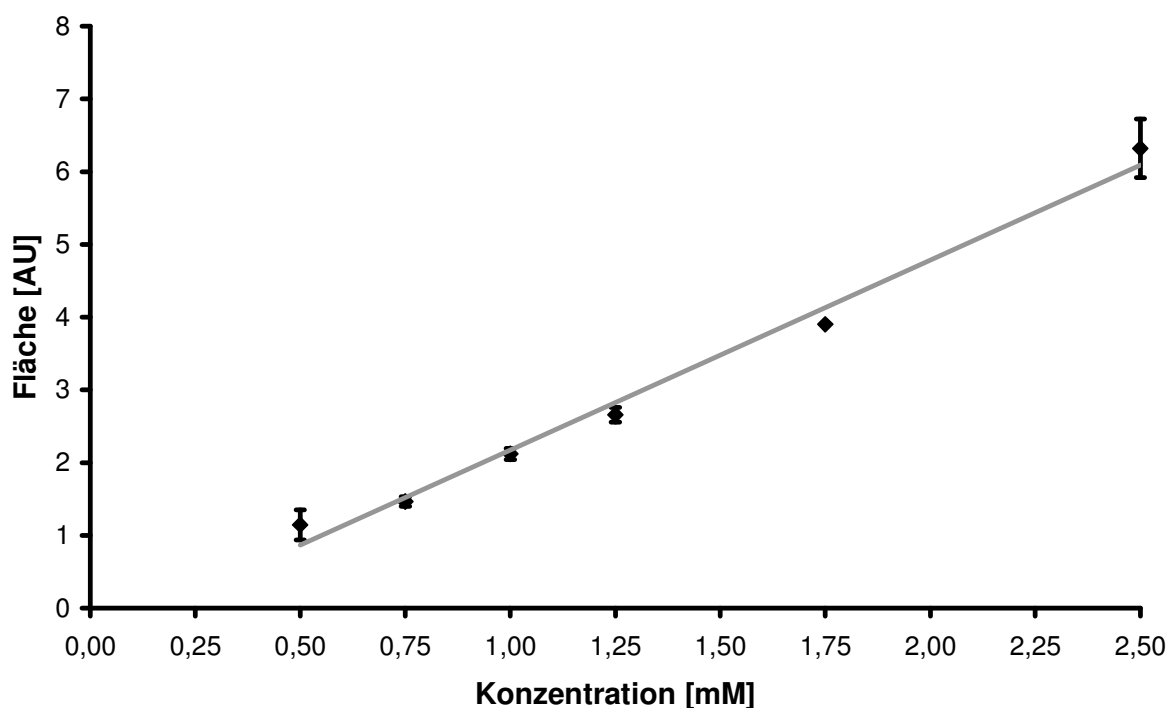


Abbildung 3.1.15 Sechs-Punkt-Kalibriergerade von Gallussäure bei einem Potential von $E = -150$ mV
Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen: 0, 5 mM, 0,75 mM
1,0 mM, 1,25 mM; 1,75 mM und 2,5 mM; Dreifachbestimmung der einzelnen Messpunkte

3.1.2.8 Amperometrische Messung von Kaffeesäure

Vergleicht man die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Gallussäure (3.1.2.7) und Kaffeesäure, das ein Zimtsäurederivat darstellt, so sind in diesem Fall die Nachweisgrenze mit 0,675 mM und die Bestimmungsgrenze mit 1,566 mM bei Kaffeesäure nochmals deutlich höher als bei Gallussäure. Aus diesem Grund ist die kleinste Konzentration der Kalibriergeraden für Kaffeesäure 1,00 mM (siehe Abbildung 3.1.16). Im Gegensatz zur Gallussäure lässt sich Kaffeesäure bis zu einer Konzentration von 3,00 mM in einem linearen Bereich detektieren. Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden beträgt 0,9972. Im

Vergleich zur Gallussäure ist die Empfindlichkeit um einen Faktor 3,2 wieder deutlich besser, auch wenn sie immer noch deutlich geringer ist als bei Hydrochinon.

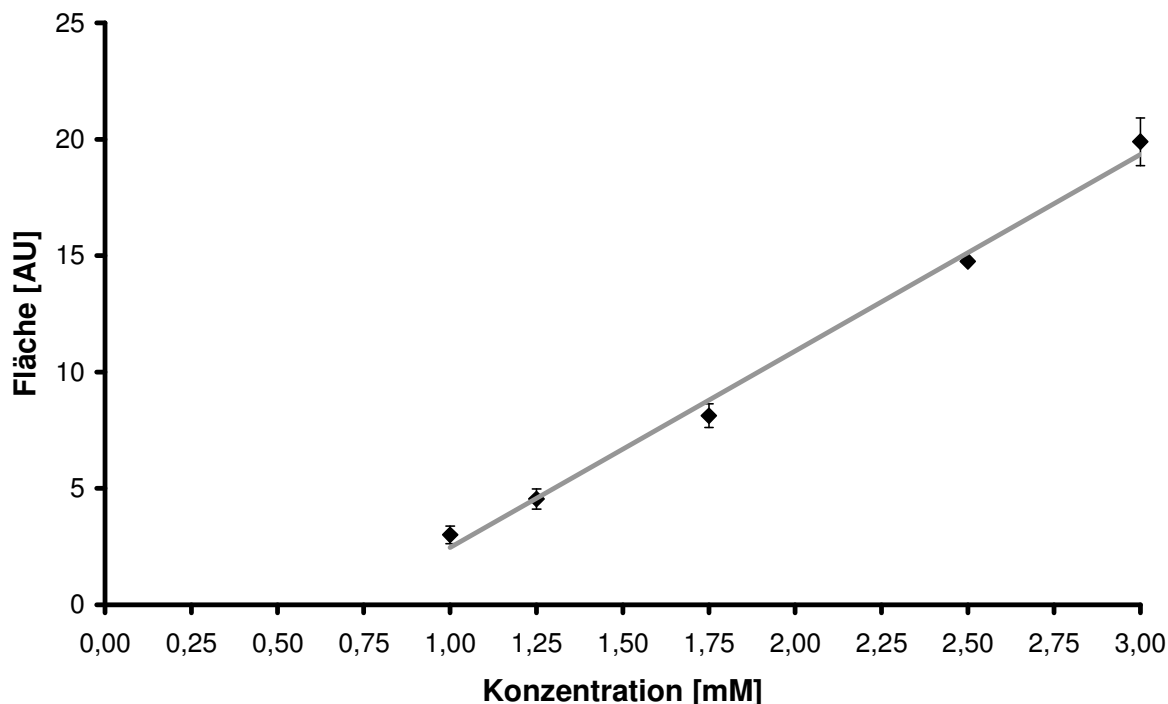


Abbildung 3.1.16 Fünf-Punkt-Kalibriergerade von Kaffeesäure bei einem Potential von $E = -150$ mV
Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Lösungen: 1,0 mM, 1,25 mM, 1,75 mM, 2,50 mM und 3,00 mM; Dreifachbestimmung der einzelnen Messpunkte

3.1.2.9 Amperometrische Messung von DL-DOPA

Im Vergleich zur Benzoesäure und Kaffeesäure stellt man bei DL-DOPA fest, dass das Messsystem die Substanz deutlich empfindlicher detektiert (Abbildung 3.1.17). Zwar ist die Empfindlichkeit deutlich geringer als bei Hydrochinon, jedoch nur noch um einen Faktor von ungefähr 5. Damit ist DL-DOPA deutlich empfindlicher detektierbar als die Testsubstanzen Gallussäure und Kaffeesäure, jedoch nicht so empfindlich detektierbar wie die Testsubstanzen Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen. Die Nachweisgrenze für DL-DOPA beträgt 0,096 mM und die Bestimmungsgrenze beträgt 0,292 mM. Damit sind Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze für DL-DOPA deutlich kleiner als Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze von 1,2-Dihydroxybenzen, obwohl bei 1,2-Dihydroxybenzen die Empfindlichkeit deutlich höher ist. Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden beträgt 0,9985. Jedoch lässt sich ein sigmoider Kurvenverlauf der Kalibrierkurve erkennen. Der Arbeitsbereich des Messsystems für DL-DOPA sollte sich deshalb zwischen 0,10 mM und 1,00 mM befinden.

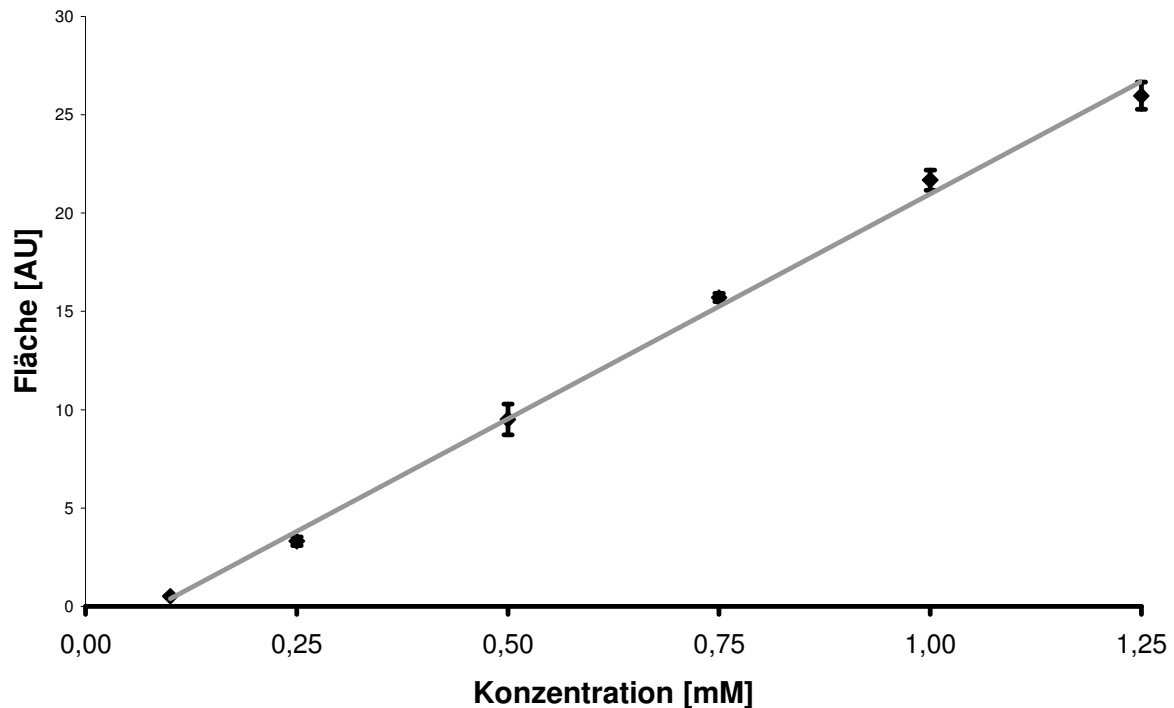


Abbildung 3.1.17 Sechspunkt-Kalibriergerade von DL-DOPA bei einem Potential von $E = -150$ mV
Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen:
0,10 mM, 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM, 1,00 mM und 1,25 mM;
Dreifachbestimmung der einzelnen Messpunkte

3.1.2.10 Beobachtungen zur NHS-HiTrap[®]-Kartusche

Nach den Messungen mit den einzelnen Substanzen sind in der Enzymkartusche deutliche Verfärbungen zu sehen. Dies bedeutet, dass die entstandenen Produkte in der Enzymkartusche polymerisieren, was jedoch anscheinend keinen negativen Effekt auf die Aktivität des Enzyms hat. Die verschiedenen Kalibriergeraden zeigen keine gravierenden Abweichungen. In Abbildung 3.1.18 sind exemplarisch drei Kartuschen fotografiert worden.

Von links nach rechts:

- eine neue, noch nicht benutzte Kartusche
- eine Kartusche, mit der Hydrochinon vermessen worden ist
- eine Kartusche, mit der Kaffeesäure vermessen worden ist



Abbildung 3.1.18 Drei HiTrap®-Kartuschen

Links: neue, unbenutzte HiTrap®-Kartusche; Mitte: mit Laccase immobilisierte Kartusche nach Messungen mit Hydrochinon; Rechts: mit Laccase immobilisierte Kartusche nach Messungen mit Kaffeesäure

3.1.2.11 Substratspezifität des immobilisierten Enzyms Laccase

Aufgrund der Substratspezifität des Enzyms kommt es zu deutlich unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber einzelnen Substanzen. Dabei fällt auf, dass das Enzym die geringste Aktivität gegenüber den Substanzen Gallussäure und Kaffeesäure aufweist. Dies verdeutlicht Abbildung 3.1.19.

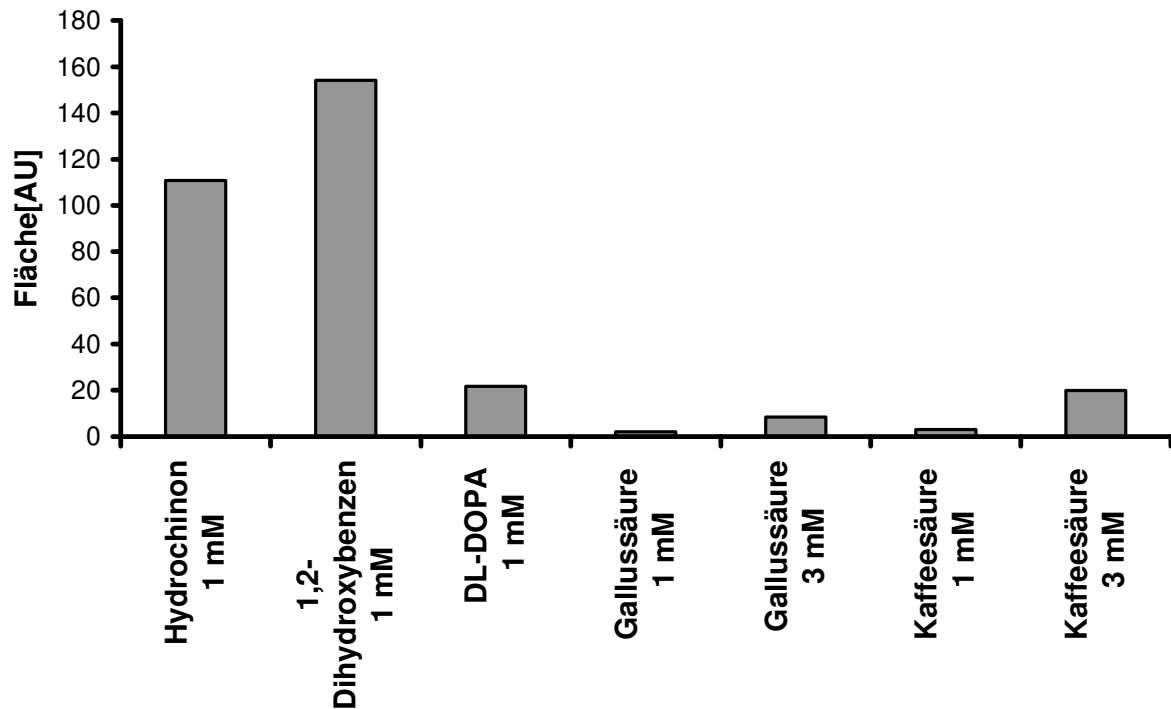


Abbildung 3.1.19 Unterschiedliche Flächen berechnet aus den Peaks der Elektropherogramme der verschiedenen Testsubstanzen

3.1.3 Versuche mit Polylactiden

3.1.3.1 Löslichkeit von verschiedenen Polylactiden

Um festzustellen, welches der zur Verfügung stehenden PLAs das geeignete ist, wurden zuerst Lösungsversuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln unternommen (siehe Tabelle 14). Bei der Auswahl der Lösungsmittel wurde besonders berücksichtigt, inwieweit das Lösungsmittel die Enzyme inaktivieren kann. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl 1,4-Dioxan wie auch Dichlormethan und NMP geeignete Lösungsmittel sein können, bei denen das Enzym seine Aktivität am wenigsten verliert [Ruiz, 2000].

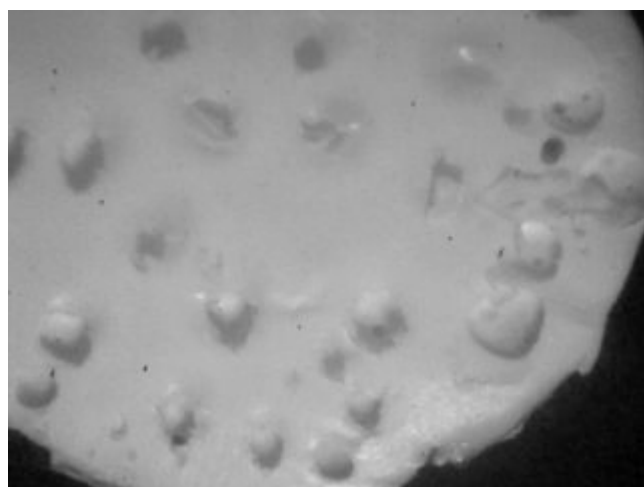
Eine sehr gute Löslichkeit von „Resomer R203S“ und „Resomer R202S“ gibt es mit allen Lösungsmitteln (siehe Tabelle 9), für das fast gar nicht lösliche „Resomer L206S“ bietet sich nur Dichlormethan an. Das Biomer-PLLA ist in Dichlormethan sehr gut löslich. Eine gute Löslichkeit ist noch mit 1,4-Dioxan und NMP gegeben. Die Löslichkeit des jeweiligen PLAs wurde nur mit der Reinsubstanz getestet.

Tabelle 14 Unterschiedliche Löslichkeit von verschiedenen Polylactiden in Lösungsmitteln

++ = sehr gut löslich; + = gut löslich; +/- = schwach löslich; - = nicht löslich

	Resomer® R 203 S	Resomer® R 202 S	Resomer® L 206 S	Biomer PLLA
1,4-Dioxan	++	++	-	+
Ethylacetat	++	++	-	-
Aceton	++	++	-	-
DMSO	++	++	+/-	-
NMP	++	++	+/-	+
Dichlormethan	++	++	+	++

In Abbildung 3.1.20 ist exemplarisch PLA nach dem Trocknen dargestellt. Man kann deutliche Löcher erkennen, die durch das Abdampfen des Lösungsmittels entstanden sind. Bei der relativ planen Fläche handelt es sich um die Unterseite des PLAs, die bei der Trocknung auf eine Oberfläche aufgegeben wurde.

**Abbildung 3.1.20**

Aufnahme von PLA bei einer 10-fachen Vergrößerung und Auflicht. Aufnahme von der Unterseite. Deutlich erkennbar sind die durch die Trocknung entstandenen Blasen

3.1.3.2 Herstellung eines Polymerfilms auf der Elektrodenoberfläche

Da neben dem Polymer und dem Lösungsmittel zusätzlich zur Herstellung eines elektrisch leitfähigen Polymers (siehe auch 3.1.1.3) eine leitfähige Substanz benötigt wird, wurde zur Herstellung eines Polymerfilms auf einer Elektrodenoberfläche dem PLA-/Lösungsmittelgemisch Aktivkohle zugefügt. Des Weiteren wurden dem Gemisch Phosphatpuffer als Simulanz zugesetzt, um die Auswirkungen einer Enzymlösung auf das Polymergemisch zu untersuchen.

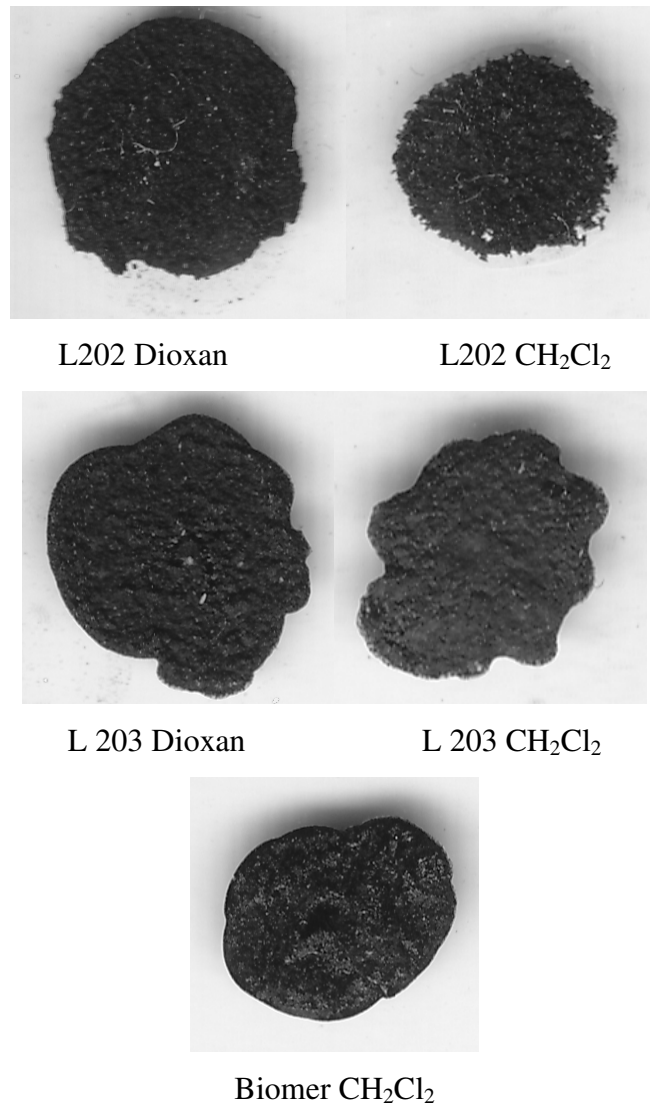


Abbildung 3.1.21 Aufnahme verschiedener Polylactid/Kohlenstoffmischungen, die vorher mit Dioxan oder Dichlormethan gelöst worden sind und an der Luft getrocknet wurden

3.1.3.3 Erhöhung der Leitfähigkeit von PLA

PLA ist nicht leitend. Um eine Leitfähigkeit zu erhalten, muss ein leitender Stoff in das PLA dotiert werden. Um eine feine Verteilung des leitenden Materials im PLA zu erhalten, wurden zwei verschiedene Pulver getestet. Zum einen wurde Kupferpulver verwendet, da Kupfer einer der besten elektrischen Leiter ist. Die Verwendung sollte das Enzym nicht zu sehr schädigen, da es sich bei Laccase um ein Enzym mit Kupfer als Kofaktor handelt.

Zum anderen wurde Kohlepulver bzw. Aktivkohle als ein weiterer sehr guter elektrischer Leiter eingesetzt.

Vergleicht man beide Elektropherogramme (Abbildung 3.1.22), so erkennt man, dass die mit dem Kupferpulver dotierte PLA-Beschichtung ein höheres Grundrauschen liefert als die Aktivkohle dotierte PLA-Beschichtung. Da es zu keinem signifikanten 1,2-Dihydroxybenzenpeak an beiden Elektroden kommt, wurde aufgrund der besseren

Möglichkeit zur Verarbeitung und aufgrund des geringeren Grundrauschens die Kohlenstoff-Dotierung bevorzugt.

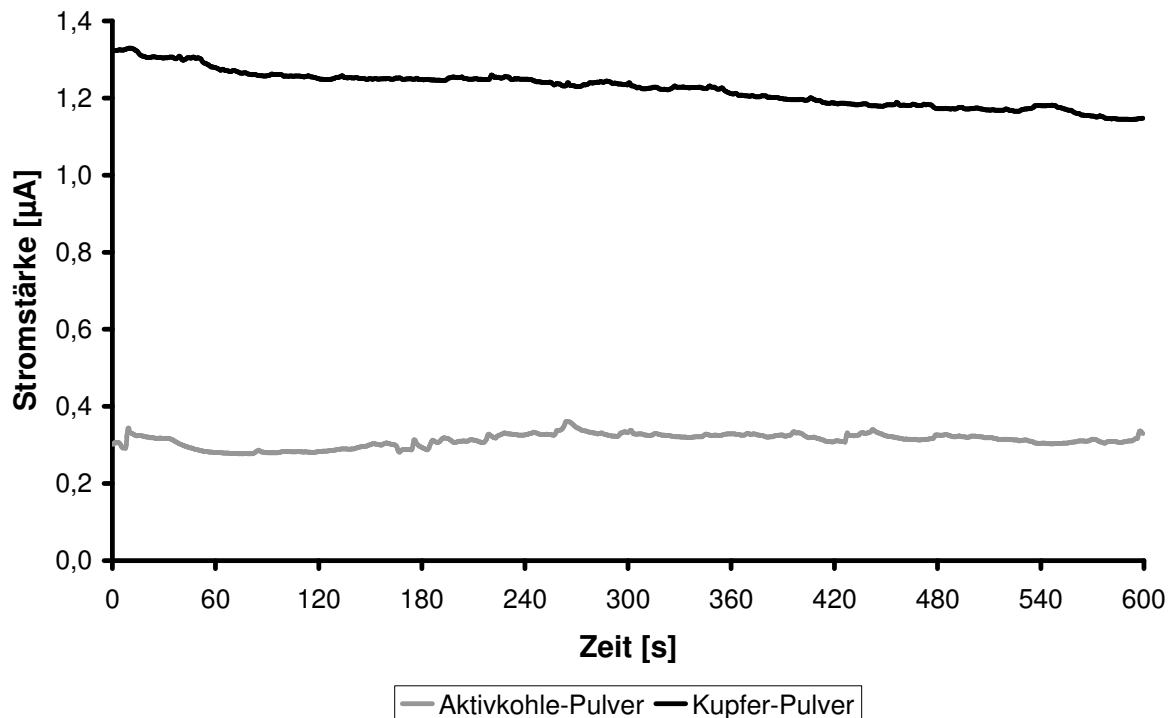


Abbildung 3.1.22 Messung mit einer GC-Elektrode

Die mit kupferdotiertem PLA bzw. mit aktivkohledotiertem PLA beschichtet worden ist.

Testsubstanz: 10 mM 1,2-Dihydroxybenzen in Citrat-Puffer 0,1 M pH 5; Potential $E = 800$ mV

3.1.3.4 Vergleich Platin- und Glassy-Carbon-Elektrode

Da es für das bestehende Wall-Jet-Zellen-System verschiedene Materialien für die Arbeitselektrode gibt, wurde in diesem Versuch eine Platin-Arbeitselektrode mit einer GC-Arbeitselektrode verglichen. Dabei wurden beide Elektroden mit einem PLA beschichtet, welchem vorab Aktivkohle zugesetzt worden war.

Wie sich in Abbildung 3.1.23 erkennen lässt, erhält man mit der GC-Elektrode ein deutliches Signal für 1,2-Dihydroxybenzen, während mit der Platin-Elektrode kein Peak zu erkennen ist. Daraus ergibt sich, dass mit der GC-Elektrode weitergearbeitet wurde.

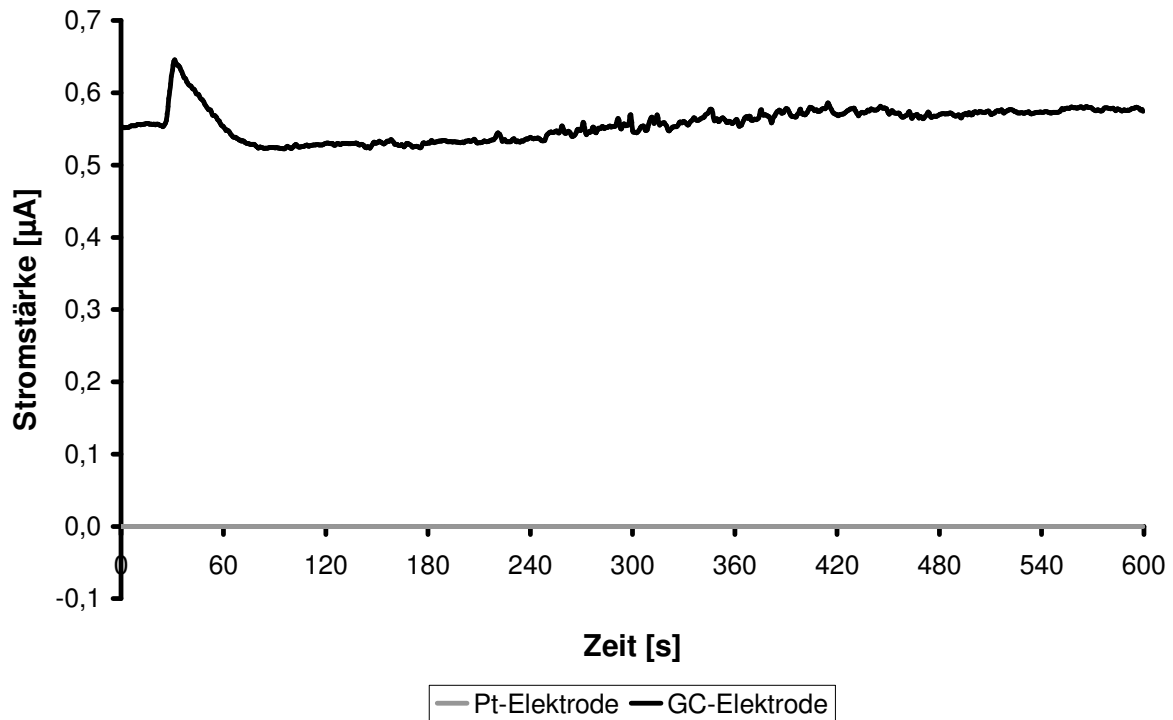


Abbildung 3.1.23 Messung mit einer Platin- und GC-Elektrode
Die Elektroden sind mit Aktivkohle dotiertem PLA beschichtet worden ist. Substanz: 10 mM 1,2-Dihydroxybenzen in Citrat-Puffer 0,1 M pH 5; Potential $E = 800$ mV

3.1.3.5 Überprüfung der Linearität mittels Referenzsubstanz

Zur Überprüfung der Linearität des Systems wurde eine 1,2-Dihydroxybenzen-Kalibriergerade mit einem Konzentrationsbereich von 2,5 – 10,0 mM vermessen. Dabei handelt es sich um eine Vier-Punkt-Kalibriergerade.

Wie in Abbildung 3.1.24 zu erkennen ist, gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen der erhaltenen Fläche und der Konzentration. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9941. Damit ist es mit dem Testsystem möglich, die nächsten Versuche durchzuführen.

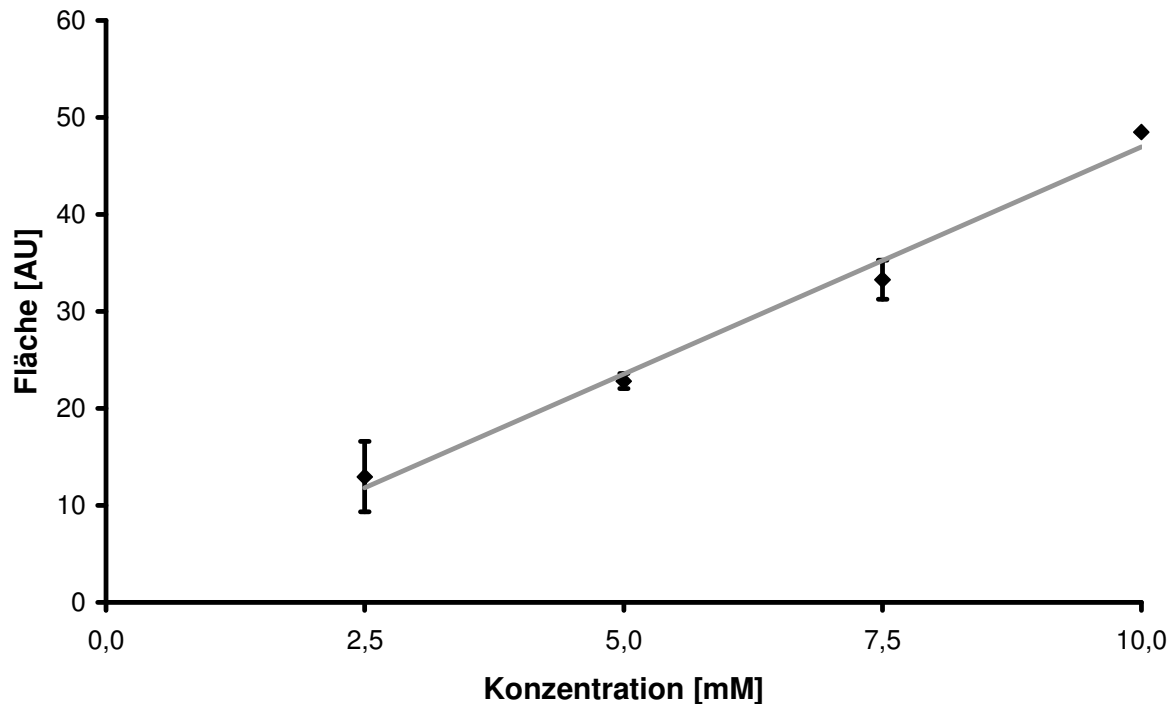


Abbildung 3.1.24 Vier-Punkt-Kalibriergerade von 1,2-Dihydroxybenzen bei einem Potential von $E = 800 \text{ mV}$
Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen:
2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM; 10,0 mM; Dreifachbestimmung

3.1.4 Messungen PLA-beschichteter Enzym-Elektroden

3.1.4.1 Messungen mit beschichteter Elektrode und Enzymkartusche

Bevor die Immobilisierung des Enzyms direkt auf die Arbeitselektrode erfolgte, wurde ein weiterer Vortest durchgeführt. Dabei wurde eine mit Aktivkohle dotierte PLA beschichtete Elektrode als Arbeitselektrode verwendet und vor der Wall-Jet-Zelle erneut eine Enzymkartusche in die Fließinjektionsanlage eingebaut. Auch in diesem Fall wird die Linearität des Systems getestet. Da das Enzym jedoch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Hydrochinon als gegen 1,2-Dihydroxybenzen hat, wurde in diesem Test als Probensubstanz Hydrochinon verwendet.

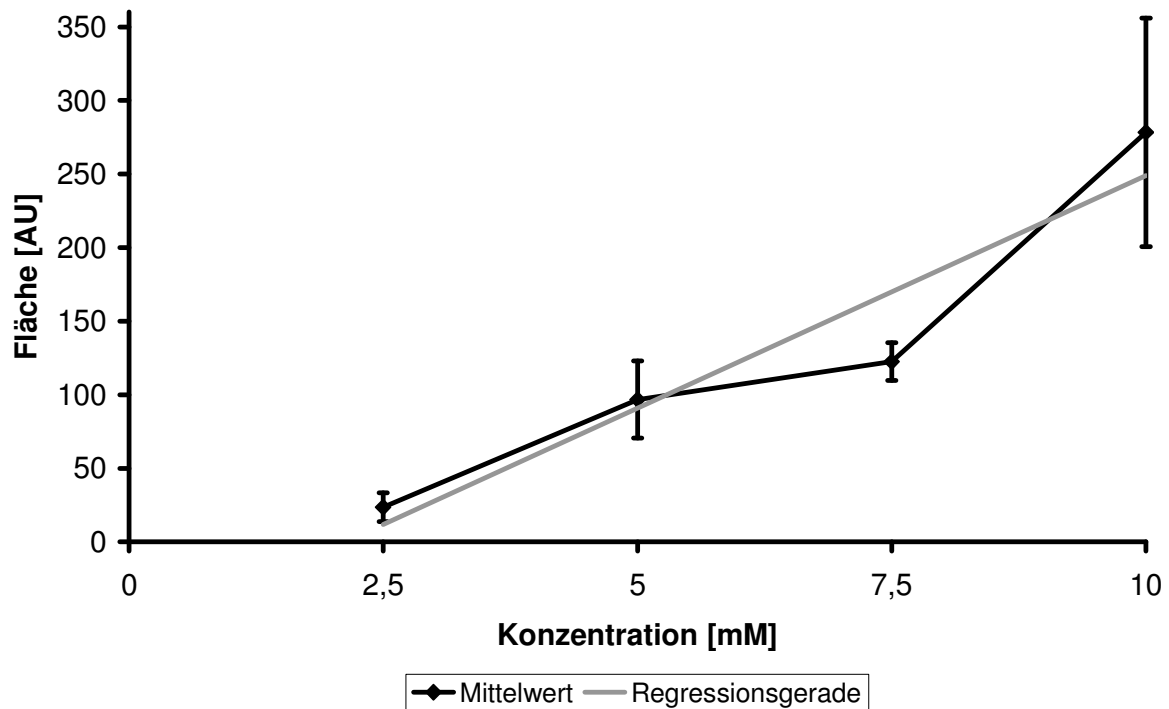


Abbildung 3.1.25 Vier-Punkt-Kalibriergerade von Hydrochinon bei einem Potential von $E = -800 \text{ mV}$
 Puffer: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5; Konzentrationen der Mess-Lösungen:
 2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM; 10,0 mM; Dreifachbestimmung

Wie man aus Abbildung 3.1.25 erkennen kann, gibt es einen sigmoiden Verlauf der Kalibriergeraden. Ebenfalls fallen die großen Standardabweichungen auf. Da die Messungen bei einem negativen Potential vermessen worden sind, erhält man einen negativen Peak. Durch die Berechnung der Flächen erhält man wieder positive Werte, die in der Kalibriergeraden dargestellt sind.

3.1.4.2 Puffersysteme für Laccase

Zur Vermeidung von größeren Verlusten der Laccase, wurde die Laccase nicht direkt der Polymer-Mischung zugefügt, sondern in gelöster Form, um eine Hydrathülle um das Enzym zu erhalten. Zur Lösung der Laccase wurde sowohl der Citrat-Puffer verwendet, das auch als Laufmittel diente, sowie ein Phosphat-Puffer mit einem pH von 7,2 und einer Konzentration von 0,07 M.

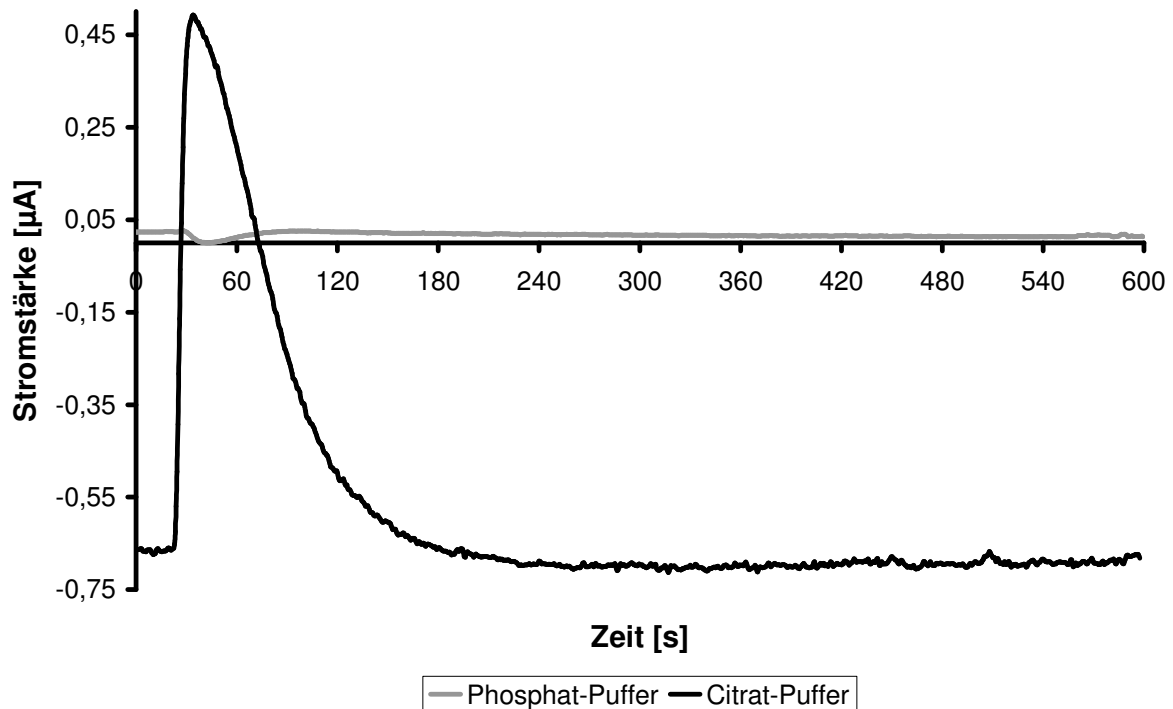


Abbildung 3.1.26 Messung einer 1,2-Dihydroxybenzen-Lösung $c = 10 \text{ mM}$ in verschiedene Puffer Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 5$ und Phosphat-Puffer $0,07 \text{ M}$, $\text{pH } 7,2$; Verwendung einer GC-Elektrode; Potential $E = 200 \text{ mV}$; Zusammensetzung des Polymers: Aktivkohle: 25 mg ; PLA 125 mg gelöst in 1 ml Dichlormethan; Laccase-Lösungen: 5 mg Laccase in 1 ml Puffer gelöst

Wie man deutlich in Abbildung 3.126 erkennen kann, gibt es für die in Citrat-Puffer gelöste Laccase einen deutlich positiven Peak. Bei der in Phosphat-Puffer gelösten Laccase erhält man hingegen im Vergleich einen schwachen negativen Peak. Da jedoch nach den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche ein negativer Peak erwartet worden ist, wurde mit der in Phosphat-Puffer gelösten Laccase weitergearbeitet.

3.1.4.3 Cyclische Voltammetrie

Mit Hilfe der cyclischen Voltammetrie ist es möglich, qualitative Aussagen über elektrochemische Vorgänge zu erhalten. Betrachtet man nun Abbildung 3.1.27, so erkennt man einen Oxidations-Peak bei 280 mV und den dazu zugehörigen Reduktions-Peak bei -10 mV . Daraus ergibt sich, dass die zukünftigen Messungen alle bei einem Potential von $E = 280 \text{ mV}$ vermessen worden sind.

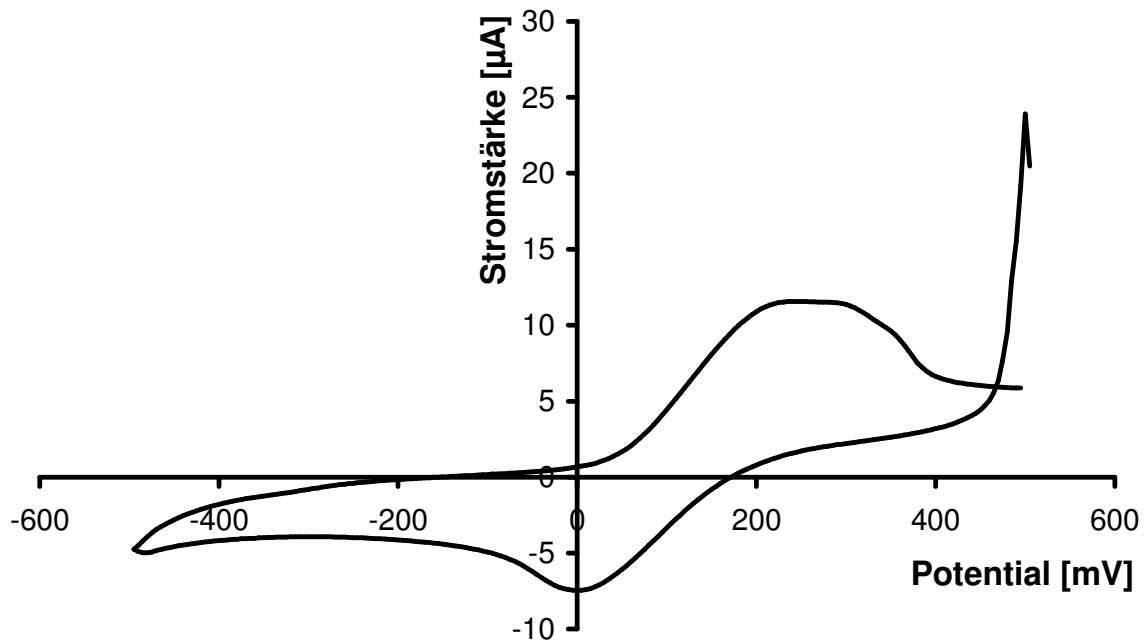


Abbildung 3.1.27 Cyclisches Voltammogramm von Hydrochinon
Arbeits Elektrode GC-Elektrode mit Polymer/Laccase-Beschichtung

3.1.4.4 Tests mit verschiedenen Polymer-Zusammensetzungen

Da es sich bei dem Polymer nicht um eine Einzelkomponente handelt, sondern um ein Gemisch aus verschiedenen Stoffen (Basis: PLA gelöst in Dichlormethan, Dotierung von Aktivkohle und Zugabe einer Laccase-Lösung bestehend aus gelöstem Enzym in Phosphat-Puffer), wurden verschiedene Zusammensetzungen der einzelnen Komponenten getestet. Dabei wurden nur die Mengen an PLA und Aktivkohle verändert, während die Zugabe der Laccase-Lösung und des Lösungsmittels gleich geblieben ist. Als Lösungsmitteln wurden NMP, 1,4-Dioxan und Dichlormethan verwendet.

Es wurden Testmischungen mit den PLAs „Resomer R 203 S“, „Resomer R 202 S“ und Biomer untersucht. Da das PLA „Resomer L 206 S“ schlechte Lösungseigenschaften hat, wurde es bei diesen Versuchen nicht mehr berücksichtigt.

In Tabelle 15 wurden die beiden Resomer-PLAs miteinander verglichen. Dabei ist in diesem Fall die Zusammensetzung von PLA und Aktivkohle gleich geblieben. Verändert wurde das Lösungsmittel. Es wurde zum einen Dichlormethan verwendet, zum anderen 1,4-Dioxan.

Tabelle 1 Vergleich von „Resomer R 202 S“ und „Resomer R 203 S“ mit verschiedenen Lösungsmitteln; Fließinjektionsanalyse von Hydrochinon; Potential E= 280 mV, Arbeitselektrode: GC-Elektrode; Fließmittel: Citrat-Puffer, 0,1 M, pH 5

	Probe I	Probe II	Probe III	Probe IV
PLA	Resomer R 203 S 200 mg	Resomer R 203 S 200 mg	Resomer R 202 S 200 mg	Resomer R 202 S 200 mg
Aktivkohle	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
1,4-Dioxan	1 mL		1mL	
Dichlormethan		1 mL		1mL
Laccase: 5mg/mL Puffer	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Detektion von Hydrochinon	-	-	-	-

Wie man erkennt, war es bei diesen Zusammensetzungen nicht möglich, Hydrochinon zu detektieren. Aus diesem Grund wurden die Zusammensetzungen nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 2 Vergleich von verschiedenen Biomer-PLA Zusammensetzungen; Messungen mit einer GC-Arbeitselektrode; + = Detektion möglich; -- = Detektion nicht möglich

Probe	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
PLA [mg]	100	75	75	50	50	125	125	150	150	150
Aktivkohle [mg]	25	25	50	25	25	25	50	100	25	50
Dichlormethan [ml]	1	1	1	NMP 1 mL	1	1	1	1	1	1
Laccase-Lösung [µL]	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Detektion von Hydrochinon	+	+	--	--	Nicht getestet	+	--	--	+	--

In Tabelle 16 sind verschiedene Biomer-PLA-Zusammensetzungen getestet worden. Auffällig ist, dass bei allen Proben, mit denen es möglich war, Hydrochinon zu detektieren, die Menge an Aktivkohle gleich ist. Eine zu hohe Aktivkohle-Konzentration bewirkte, dass die Adhäsionskräfte zwischen Beschichtung und Elektrode nicht stark genug waren, so dass die Beschichtung nicht an der Arbeitselektrode haften blieb.

Tabelle 17 Vergleich von verschiedenen Resomer-PLA Zusammensetzungen; Messungen mit einer GC-Arbeitsselektrode; + = Adhäsion; -- = keine Adhäsion

Probe	I	II	III	IV	V	VI
PLA	R 203 S	R 203 S	R 203 S	R 202 S	R 202 S	R 202 S
PLA [mg]	100	75	150	100	75	150
Aktivkohle [mg]	50	25	25	50	25	25
Dichlormethan	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Laccase Lösung [μL]	200	200	200	200	200	200
Adhäsion der Beschichtung	--	--	--	--	--	--

Zur Überprüfung, ob die mit dem Biomer-PLA einsetzbaren Zusammensetzungen auf die Resomer-PLAs übertragbar sind, wurden identische Resomer-Zusammensetzungen getestet. Wie aus Tabelle 17 zu erkennen ist, haben die Resomer-PLAs auf der GC-Arbeitsselektrode nicht gehaftet.

Vergleicht man die Viskosität der einzelnen Biomer-Zusammensetzungen, so ergibt sich, dass eine Zusammensetzung mit 125 mg PLA und 25 mg Aktivkohle diejenige ist, die sich am besten verarbeiten lässt. Dies ist die resultierende Standardzusammensetzung für die nachfolgenden Messungen.

3.1.4.5 Mehrfachmessungen von Hydrochinon

Die Robustheit eines Systems kann man einfachsten überprüfen, indem man mehrer Messungen einer Substanz mit gleicher Konzentration durchführt. Dabei sollte sich der erhaltene Wert nicht oder nur kaum verändern. Es wurde die Substanz Hydrochinon achtmal hintereinander vermessen (siehe Abbildung 3.1.28). Dabei wird deutlich, dass es eine Korrelation gibt zwischen Anzahl der Messungen und einer Verringerung der resultierenden Flächen. Dabei ergibt sich in diesem Beispiel ein Mittelwert der Fläche von $1,58 \pm 0,35$ AU.

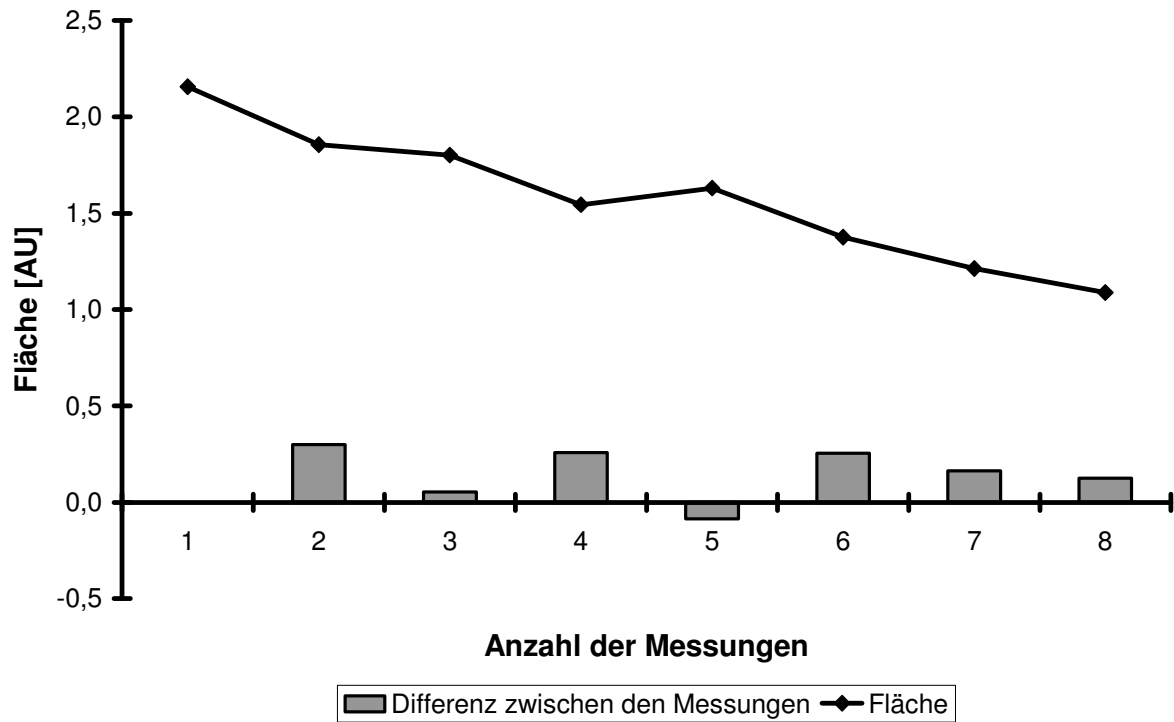


Abbildung 3.1.28 Zusammenhang zwischen der Anzahl der Messungen einer beschichteten GC-Elektrode mit der Abnahme der Flächen
 Probelösung: Hydrochinon-Lösung $c = 10 \text{ mM}$; Fließmittel: Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 5$,
 Potential $E = 280 \text{ mV}$

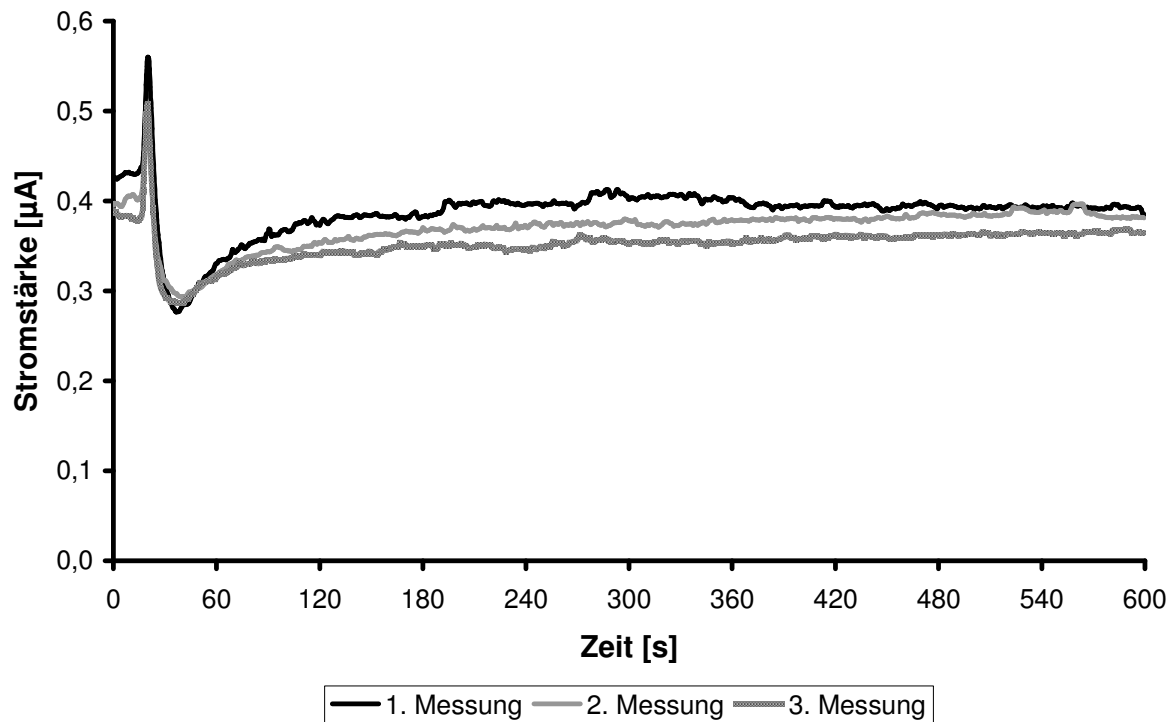


Abbildung 3.1.29 Voltammogramme hintereinander durchgeführter Messungen
 Es ist deutlich die Basislinienveränderung nach dem Peak zu erkennen.
 Probelösung: Hydrochinon-Lösung $c = 1,0 \text{ mM}$; Fließmittel: Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 5$,
 Potential $E = 280 \text{ mV}$

Die Veränderung der Fläche resultiert aus einem Absinken der Stromstärke der Basislinie, wie man in Abbildung 3.1.29 erkennen kann. Daraus resultierend ergibt sich, dass es mit der bestehenden Konfiguration keine Möglichkeit gibt, robuste Messungen durchzuführen. Die Komponente für diesen Effekt ist das Enzym, da Messungen ohne Enzym nur mit der reinen Beschichtung keine signifikante Änderung der einzelnen Flächen aufwies.

3.1.4.6 Messungen mit negativen Potentialen

Da die benutzte Konfiguration nicht die gewünschte Robustheit aufweist, sind verschiedene Parameter geändert worden. Der erste Parameter, der verändert worden ist, ist das Potential. Um zu überprüfen, ob das System bei negative Potentialen eventuell an Robustheit gewinnt, wurde Potentiale im Bereich zwischen -200 mV und -50 mV variiert.

Dabei wurde festgestellt, dass sich die immobilisierte PLA-Zusammensetzung bei den Potentialen von -200 mV, -150 mV, und -100 mV auf der Elektrode zersetzt. Bei einem Potential von -50 mV war jedoch eine Messung von Hydrochinon möglich.

Tabelle 3 Vergleich von verschiedenen negativen Potentialen; Probelösung: Hydrochinon-Lösung $c = 1 \text{ mM}$; Fließmittel: Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, pH 5; + = Messung möglich bzw. Adhäsion der Beschichtung der Elektrode; -- = keine Messung möglich bzw. keine Adhäsion der Beschichtung

	Potential E= -200 mV	Potential E= -150 mV	Potential E= -100 mV	Potential E= -50 mV
Adhäsion der Beschichtung	--	--	--	+
Detektion von Hydrochinon	--	--	--	+

Wie zu erwarten war, haben die Peaks im Vergleich zu positiven Potentialen die umgekehrte Orientierung. Zur Verdeutlichung siehe Abbildung 3.1.30. Auffällig ist, dass es bei der mit Laccase beschichteten Elektrode ein größeres Grundrauschen als bei der ohne Laccase beschichteten Elektrode gibt. Jedoch ist das Grundrauschen so klein, dass es möglich ist, Proben im Bereich von $100 \text{ }\mu\text{M}$ zu vermessen.

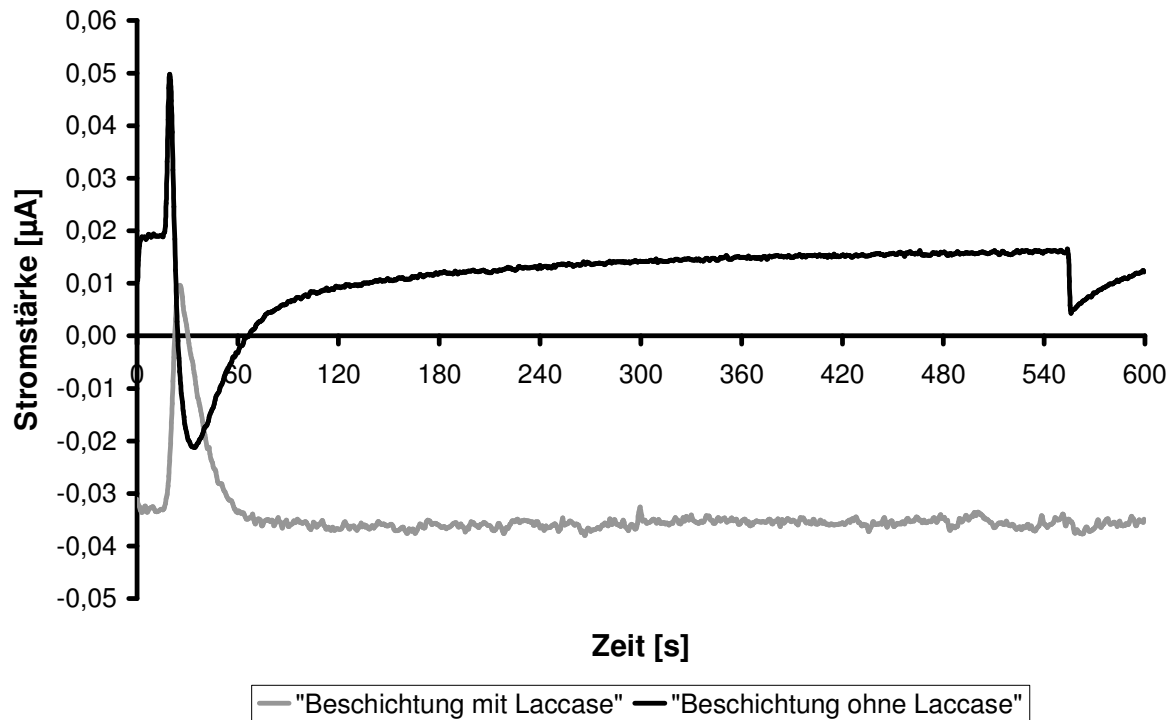


Abbildung 3.1.30 Messung bei einem Potential von $E = -50$ mV
 Es wird eine Beschichtung mit Laccase und eine Beschichtung ohne Laccase auf derselben GC-Elektrode vermessen. Probelösung: Hydrochinon-Lösung $c = 0,1$ mM; Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5

Um die Robustheit dieser Konfiguration zu überprüfen, wurden mehrere Messungen mit einer Hydrochinon-Lösung ($c = 1$ mM) vermessen. Wie bei der vorherigen Konfiguration korreliert die Anzahl der Messungen mit der Abnahme der Fläche (siehe Abbildung 3.1.31). Dabei sinkt die ermittelte Fläche auf bis zu 62,5 % der Ausgangsfläche ab.

Daraus resultierend wurde diese Änderung der Konfiguration nicht mehr weiter berücksichtigt.

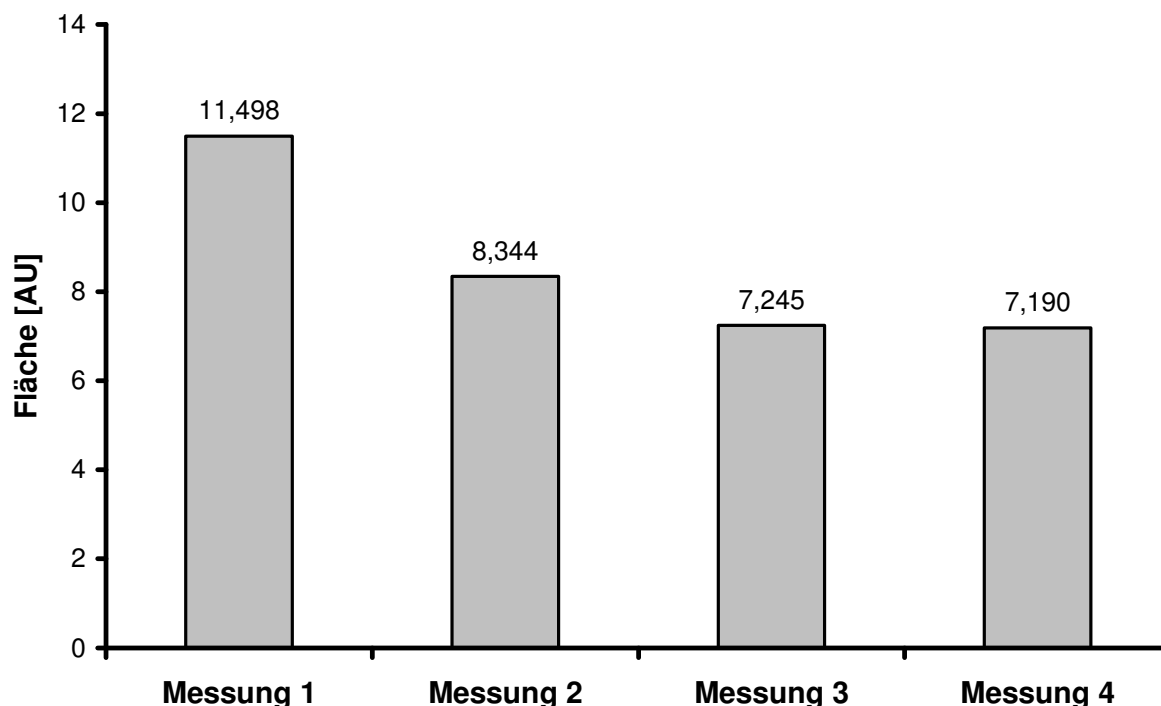


Abbildung 3.1.31 Messung einer 1 mM Hydrochinon-Lösung bei einem Potential von $E = -50$ mV. Die Messungen erfolgten in einem Abstand von jeweils 10 Minuten (dies entspricht die Zeit eines Laufes).

3.1.4.7 Verwendung von nicht konservierten Fließmitteln

Zur Stabilisierung der Puffer wurde jeweils 0,1 % Thiomersal verwendet, da es sonst nach kurzer Zeit zur Schimmelbildung in den Vorratsgefäßen kam. Es wurde überprüft, ob der konservierte Puffer einen Einfluss auf das Meßsystem hat. Dafür wurden unkonservierte Puffer hergestellt und vermessen. Es konnte festgestellt werden, dass Thiomersal einen Einfluss auf das Meßsystem hat.

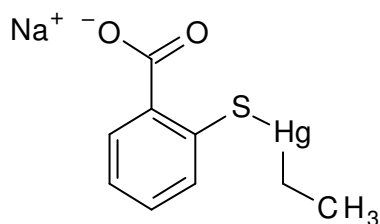


Abbildung 3.1.32
Thiomersal, auch Merfamin

Vergleicht man die Flächen der in Abbildung 3.1.33 dargestellten Peaks, so stellt man fest, dass die Fläche bei der Messung mit dem unkonservierten Fließmittel um fast 700 % größer ist als die Fläche bei der Messung mit konserviertem Fließmittel (Fläche unkonserviert 3,588 AU; Fläche konserviert: 0,513 AU).

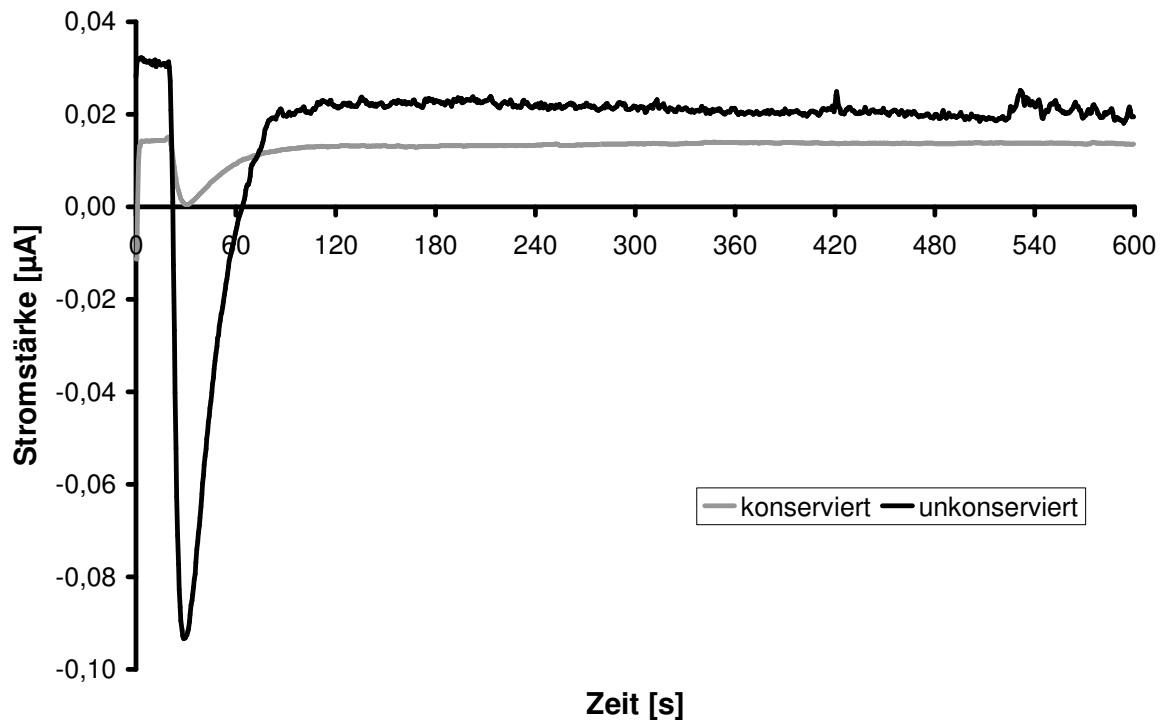


Abbildung 3.1.33 Messung bei einem Potential von $E = 280 \text{ mV}$
 Es wird eine Beschichtung mit Laccase auf derselben GC-Elektrode vermessen. Probelösung:
 Hydrochinon-Lösung $c = 0,1 \text{ mM}$; Fließmittel: Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, pH 5, konserviert mit
 $0,2 \text{ \%}$ Thiomersal/Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, pH 5, unkonserviert

3.1.4.8 Verwendung von Emulgatoren zur Stabilisierung der PLA-Zusammensetzung

Da es bei den Testgemischen mit der Zeit zu Phasentrennung gekommen ist (es war deutlich eine Phase mit Aktivkohle und eine Phase ohne Aktivkohle zu erkennen), wurde versucht, die Stabilität der Emulsion mit Emulgatoren zu erhöhen. Es wurden Tests mit den Emulgatoren „Tween 20[®]“, „Span 40[®]“, „Span 60[®]“ und „Span 65[®]“ durchgeführt.

Obwohl die Emulsion stabilisiert wurde und es zu keiner Phasentrennung mehr kam, hat dies keinen positiven Effekt auf die Messergebnisse gehabt. Wie in Abbildung 3.1.34 beispielhaft hervorgeht, kommt es zu einem deutlichen Rauschen der Basislinie. Aus diesem Grund wurden Emulgatoren nicht weiter verwendet.

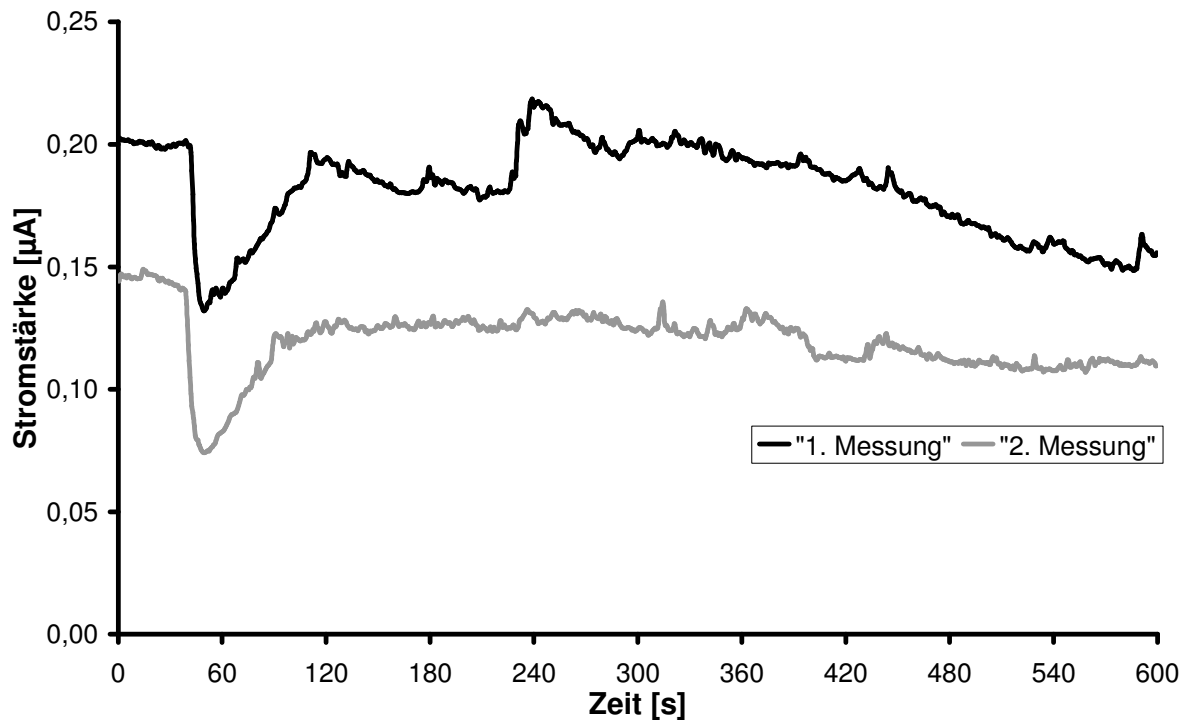


Abbildung 3.1.34 Zwei Messungen von Hydrochinon $c = 10 \text{ mM}$ mit dem Emulgator Span 40®
Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5, Potential $E = 280 \text{ mV}$, GC-Elektrode

3.1.4.9 Verwendung von Carbon Nanotubes anstelle von Aktivkohle

Anstelle von Aktivkohle wurden in der PLA-Zusammensetzungen MWCNT verwendet. Erste Messungen wurden ohne Enzym durchgeführt.

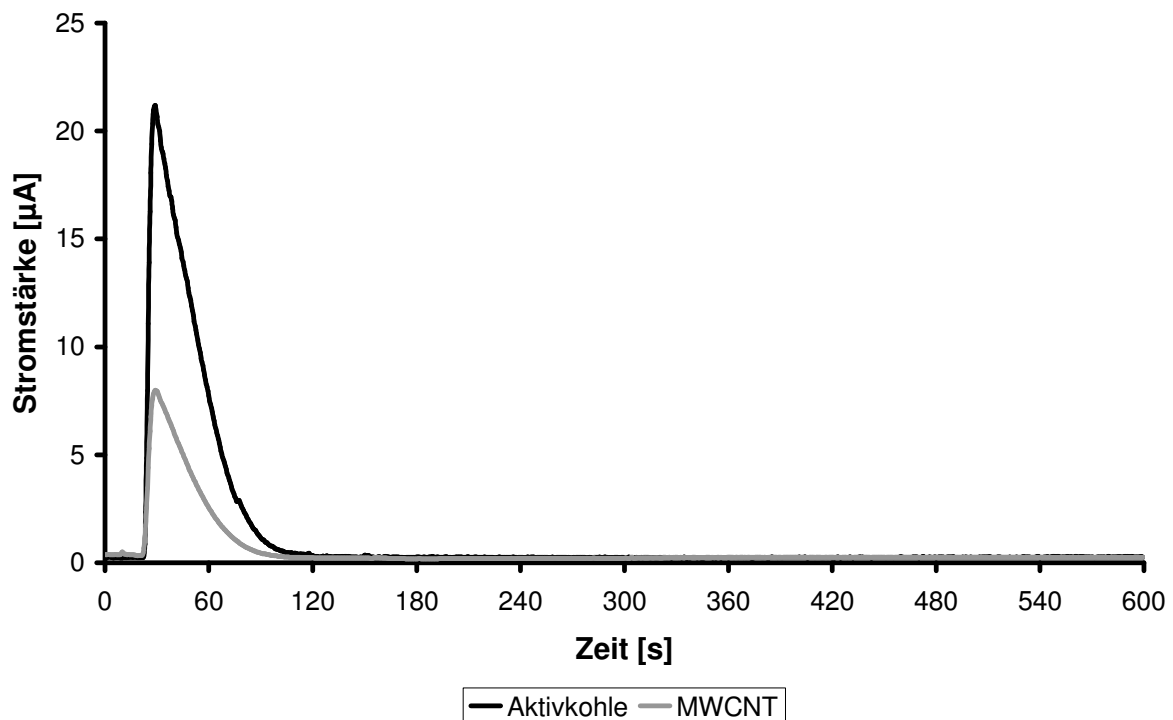


Abbildung 3.1.35 Messung einer Hydrochinon-Lösung $c = 10 \text{ mM}$
Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5, Potential $E = 280 \text{ mV}$, GC- Elektrode;

Probe ohne Enzym

Wie in Abbildung 3.1.35 zu erkennen, ist die Signalstärke der mit Aktivkohle hergestellten Probe deutlich höher im Vergleich zu der mit MWCNT hergestellten Probe.

Um dies auszugleichen wurden die MWCNT funktionalisiert, in dem sie in oxidierendem, sauerem Milieu für mehrere Stunden unter Rückfluss gekocht wurden. Durch das Kochen wurden in die MWCNT Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen eingeführt. Des Weiteren werden die einzelnen MWCNT-Röhren in ihrer Länge gekürzt.

Aus diesen funktionalisierten MWCNT wurden neue Beschichtungs-Proben hergestellt, mit denen eine 10 mM-Hydrochinon-Lösung an verschiedenen Tagen vermessen worden ist. Das Ergebnis ist aus Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 4 Messungen einer 10 mM Hydrochinon-Lösung mit einer beschichteten GC-Elektrode an verschiedenen Tagen; für die Werte 7,7159 und 16,5595 wurden Ausreißer-Tests nach Grubbs vorgenommen; beide Werte sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % keine Ausreißer; Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5, Potential E= 280 mV

Datum	Fläche	Mittelwert	Standardabweichung
24.01.2007	3,8751	5,011	2,353
24.01.2007	3,4406		
24.01.2007	7,7159		
25.01.2007	4,0071	4,0071	
26.01.2007	5,1003	3,6042	
26.01.2007	2,1081		
29.01.2007	16,5595	9,290	5,268
29.01.2007	9,3689		
29.01.2007	4,3125		
29.01.2007	6,9191		
30.01.2007	7,9801	7,9801	
31.01.2007	5,8610	5,8610	

Der berechnete Mittelwert aus allen Tagen beträgt $5,96 \pm 2,26$. Es zeigt sich, dass die Funktionalisierung der MWCNT eine Verbesserung der Messergebnisse hervorbringt. Aus diesem Grund wurde eine Hydrochinon-Kalibriergerade mit funktionalisierten MWCNT-Beschichtungen erstellt (siehe Abbildung 3.1.36).

Im Vergleich zu den übrigen Konzentrationen der Probelösungen ergibt sich bei einer Konzentration von 10 mM eine große Standardabweichung. Man erkennt ansatzweise einen sigmoiden Verlauf der Kurve. Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergerade beträgt 0,9959.

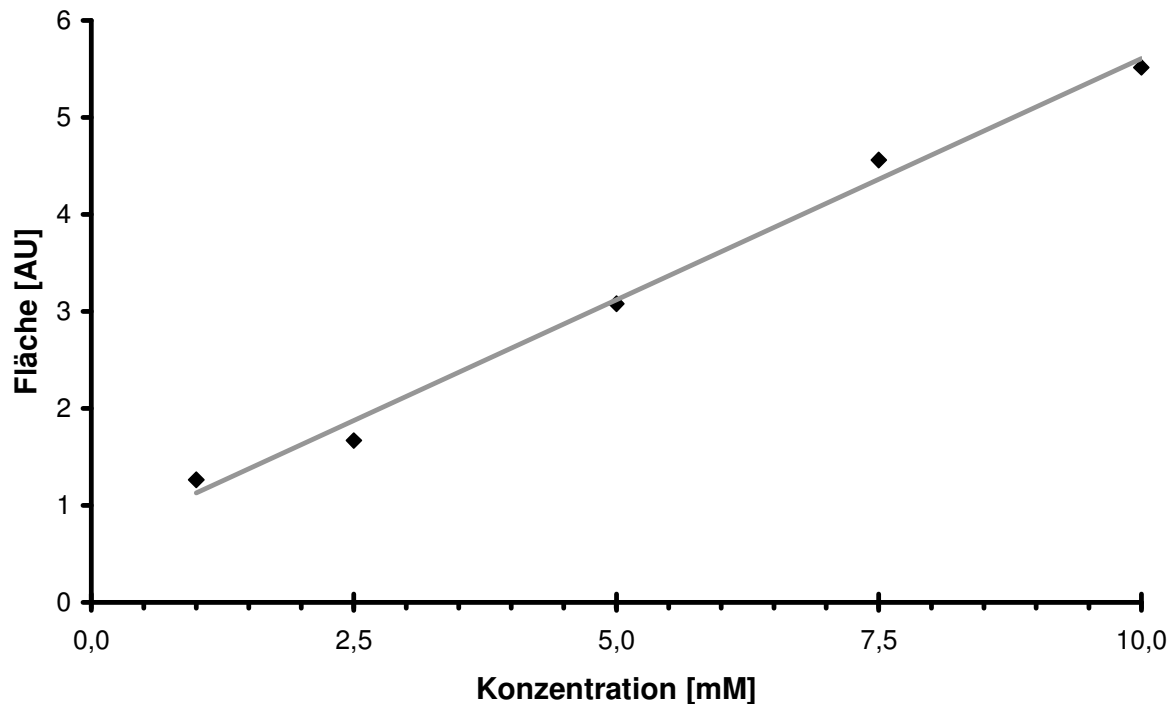


Abbildung 3.1.36 Hydrochinon-Fünf-Punkt-Kalibriergerade
Mit einer MWCNT-PLA-Beschichtung funktionalisiert. Konzentration der Hydrochinon-Lösungen: 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM und 10 mM. Alle Punkte wurden dreifach vermessen. Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5, Potential $E = 280$ mV, GC-Elektrode

In vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die Anzahl der Messungen mit einer Abnahme der erhaltenen Flächen korreliert. Um dies hier zu überprüfen, wurden von der Kalibriergeraden die ersten drei Konzentrationen (1 mM, 2,5 mM und 5 mM) verglichen (siehe Abbildung 3.1.37). Die ersten beiden Messungen wurden an einem Tage durchgeführt, die dritte Messung am nächsten Tag. Im Vergleich zu den beiden anderen Konzentrationen ist bei einer Konzentration von 2,5 mM eine leichte Abnahme des Signals zu beobachten. Bei den Konzentrationen von 1 mM und 5 mM erkennt man eine leichte Zunahme der Signale bei der letzten Messung, die erst am darauffolgenden Tag durchgeführt wurde. Auffällig ist auch, dass bei der ersten Messung das Signal der 1 mM-Lösung größer ist als das der 2,5 mM-Lösung.

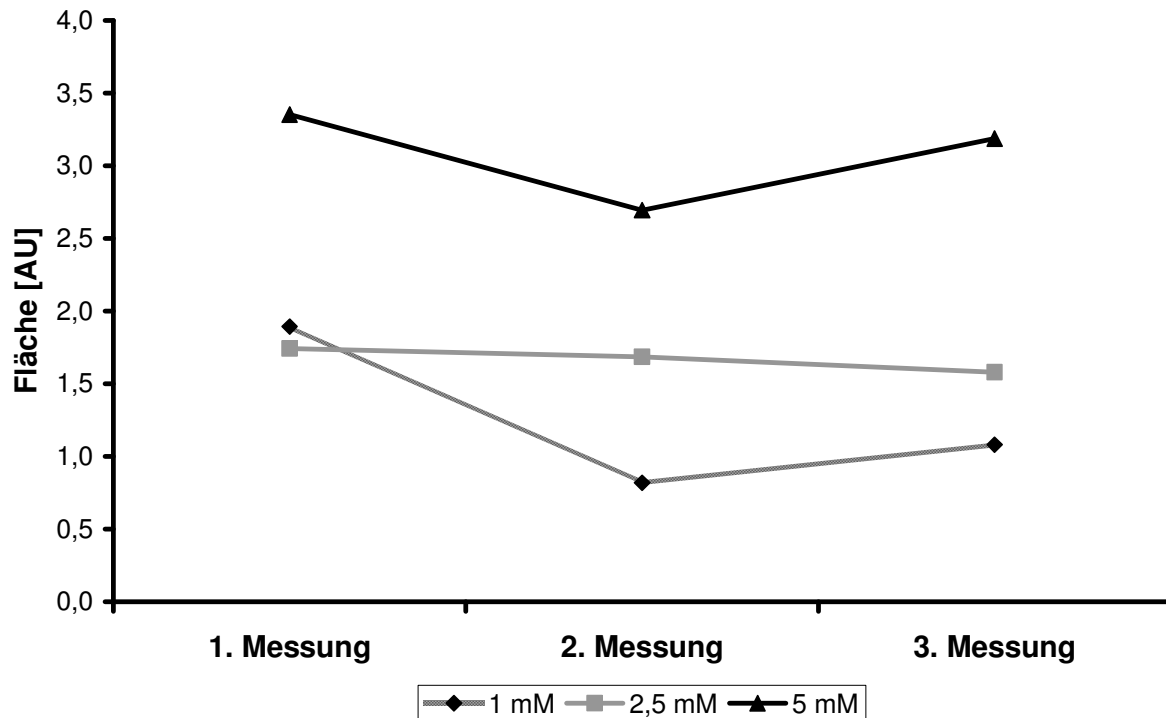


Abbildung 3.1.37 Mehrfachmessung von verschiedenen Hydrochinon-Konzentrationen
 Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5, Potential E= 280 mV, GC-Elektrode

Es wurde ein erster Lagerstabilitätstest mit einer 10 mM Hydrochinon-Probelösung durchgeführt (Abbildung 3.1.38). Die Elektrode wurde bei einer Temperatur von 4°C im Kühlschrank im Lagerpuffer gelagert. Betrachtet man die Werte, so ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Vergleicht man die ersten drei Tage, so ist eine Abnahme der Flächen zu erkennen.

Vergleicht man die letzten drei Tage, so gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Werten. Im Vergleich zu den ersten drei Tagen fällt aber auf, dass die letzten drei Tage signifikant größere Flächen haben. Beachtet werden muss, dass es sich bei den Messungen am 25.01.07, 30.01.07 und 31.01.07 um Einzelmessungen handelt. Tendenziell lässt sich sagen, dass es keinen großen Verlust an Aktivität des Enzyms über eine Woche gibt.

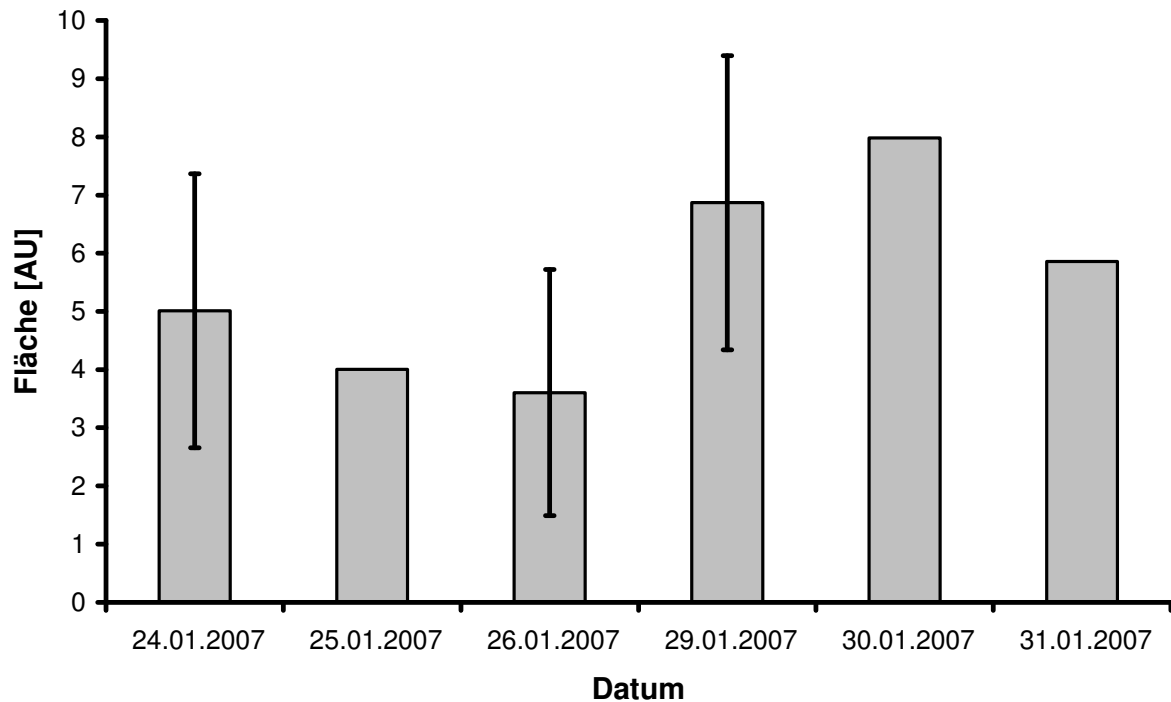


Abbildung 3.1.38 Lagerstabilitätstest; Messungen einer 10 mM Hydrochinon-Lösung
Potential $E = 280$ mV; GC-Elektrode; Fließmittel: Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5, an dem Tagen 27.01.2007 und 28.01.2007 wurden keine Messungen durchgeführt; am 25.01.2007, 30.01.2007 und 31.01.2007 wurden nur Einzelbestimmungen durchgeführt

3.1.4.10 Vergleich von verschiedenen Laccasen

Die in den Tests verwendete Laccase stammt von *Trametes versicolor*. Da es viele verschiedene Laccase gibt, die unterschiedlich aufgebaut sind und auch unterschiedliche Molmassen haben, besteht die Möglichkeit, dass andere Laccasen in dem bestehenden System eine höhere Stabilität, Robustheit und Sensitivität haben. Exemplarisch wurden neben der Laccase von *Trametes versicolor* auch die Laccase von *Agaricus bisporus* getestet (Abbildung 3.1.39). In dem bestehenden System erwies sich die Laccase von *Trametes versicolor* als die Effektivste. Ebenfalls wurde die Menge an Enzym in der Enzym-Lösung erhöht. Dies hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Signalstabilität und Robustheit des Systems.

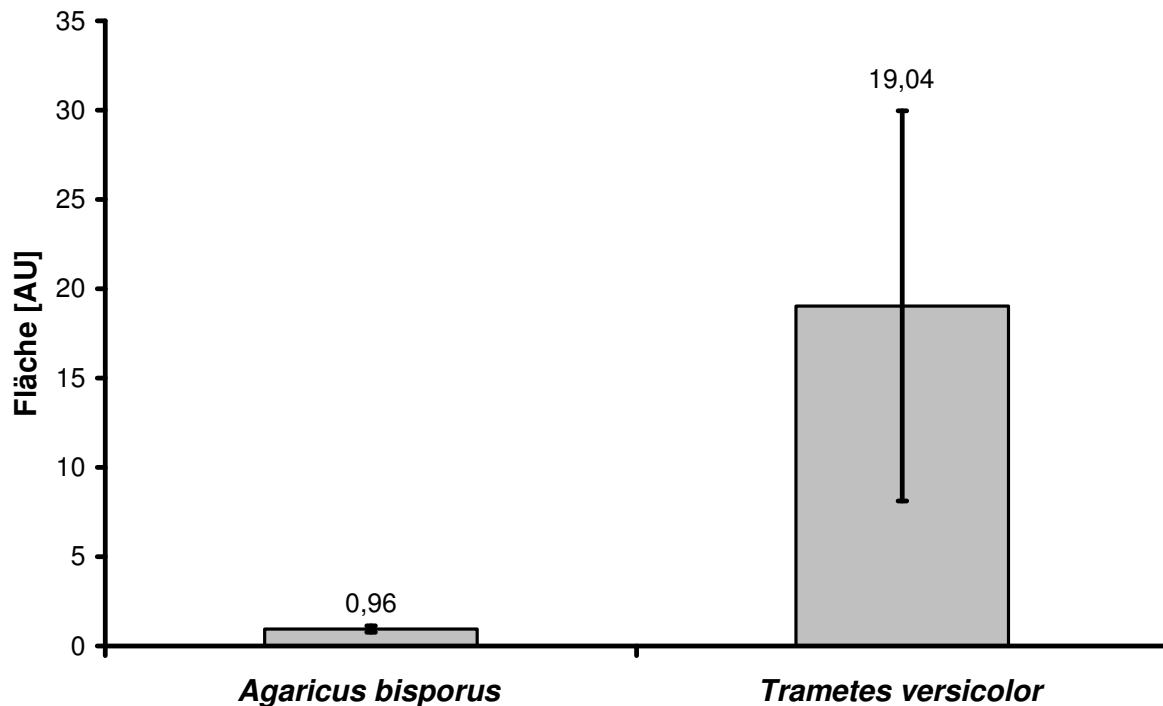


Abbildung 3.1.39 Vergleich der Enzymaktivitäten der Laccasen von *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor*. Es wurde eine 10 mM Hydrochinon-Lsg. vermessen. Puffer: 0,1 M Citrat-Puffer pH 5,0; Die Messung erfolgte amperometrisch bei einem Potential von 280 mV

3.1.4.11 Vergleich von verschiedenen Fließmitteln

Da die zu verändernden Optionen in der PLA-Zusammensetzung fast vollständig optimiert sind, jedoch der Biosensor die erwartete Stabilität und Robustheit nicht vorwies, wurden durch die Wahl der Fließmittel erneut versucht, die oben genannten Validierungsparameter zu verbessern. Da in den ersten Versuchen zur Wahl des Fließmittels (siehe 3.1.2) neben dem Citrat-Puffer der verwendete Phosphat-Puffer eine gute Empfindlichkeit des Biosensors ergab, wurde erneut ein Phosphat-Puffer getestet. Dabei handelt es sich um einen Phosphat-Puffer mit einer Konzentration von 0,1 M und einem pH-Wert von 7. Zusätzlich wurde ein Phosphat-Puffer vermessen, der zusätzlich eine NaCl-Konzentration von 0,1 M aufwies. Des Weiteren wurde dem Citrat-Puffer ebenfalls zusätzlich 0,1 M NaCl hinzugefügt.

Wie in Abbildung 3.1.40 zu erkennen ist, erhält man die besten Resultate, wenn man als Lagerpuffer weiterhin den 0,1 M Citratpuffer verwendet, aber zur Messung der Probe einen 0,1 M Phosphat-Puffer als Pufferlösung verwendet.

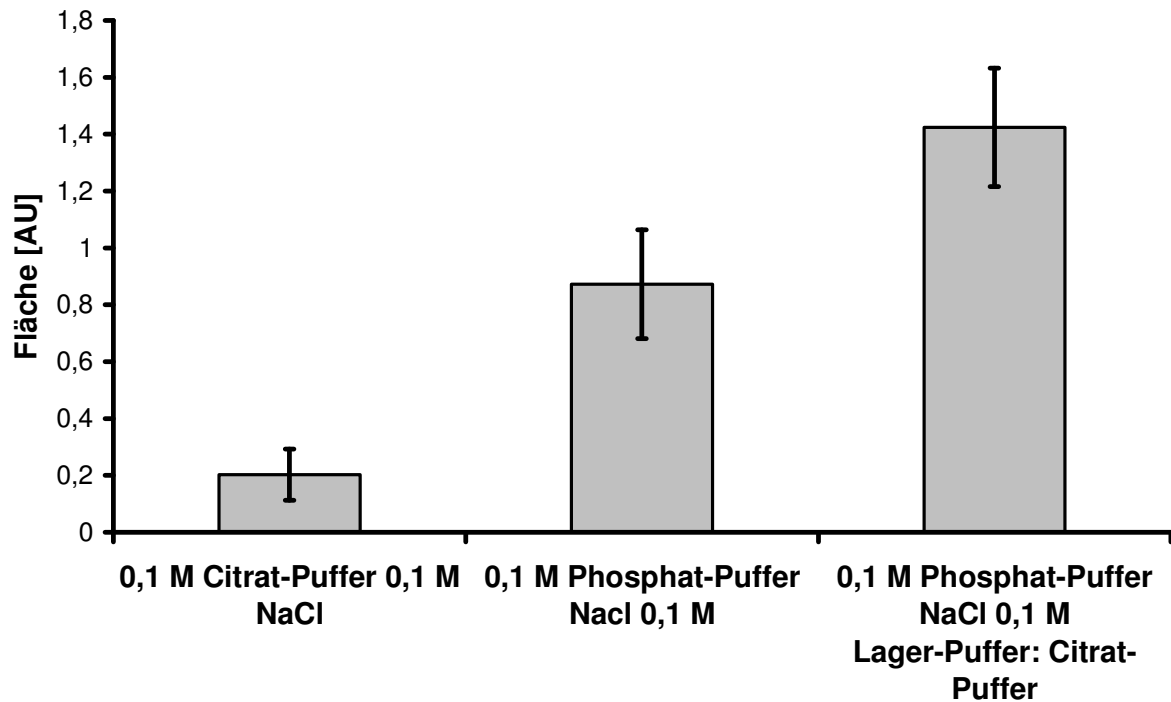


Abbildung 3.1.40 Vergleich der verschiedenen Puffer auf das Detektionsverhalten des Messsystems
Testsubstanz: 0,2 mM Hydrochinon-Lösung; Potential $E=280$ mV; Fünfachbestimmung

3.1.4.12 Quantitative Bestimmung von Referenzsubstanzen

Aufgrund der Veränderung des Fließmittels wurden erneut Messungen mit Referenzsubstanzen im vorhandenen FIA/Biosensor-System durchgeführt.

Mit folgenden Parametern erfolgten die Messungen:

Fließmittel und Lösungsmittel für die Proben: Phosphatpuffer III

Arbeitselektrode: GC-Elektrode

Potential: $E=280$ mV

Laccase: *Trametes versicolor*

Die PLA-Probe wurde mit Multi-Walled Carbon Nanotubes versetzt.

Wurde eine längere Zeit nicht gemessen, so wurden die beschichteten Elektroden im Citrat-Puffer bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte nach DIN 32645.

3.1.4.12.1 Quantitative Bestimmung von Hydrochinon

Durch die Verwendung des Phosphat-Puffers und einer höheren Laccase-Konzentration ist es nun möglich, Hydrochinon in μM Bereich zu detektieren (siehe Abbildung 3.1.41).

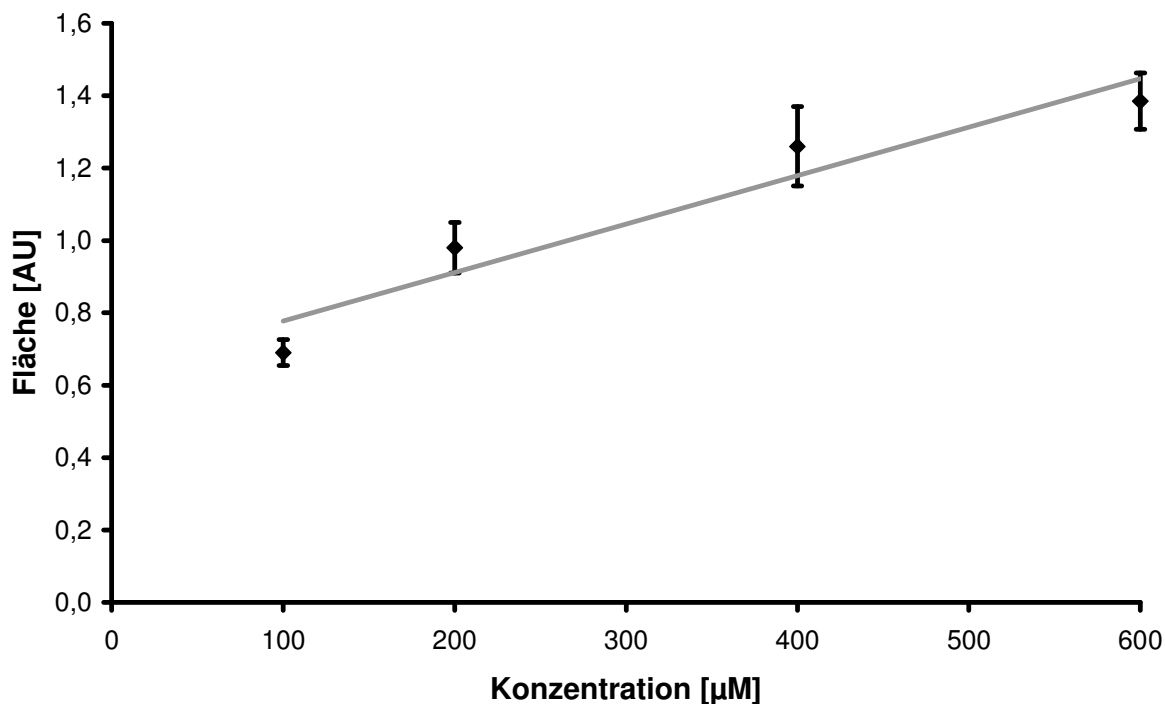


Abbildung 3.1.41 Vier-Punkt-Kalibriergerade für Hydrochinon
Messpunkte: 100 µM, 200 µM, 400 µM und 600 µM; dreifach Bestimmungen aller
Messpunkte; GC-Elektrode; Potential $E = 280$ mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7,
NaCl 0,1 M

Nachdem mit der obigen Vier-Punkt-Kalibriergerade gezeigt werden kann, dass das System mit kleinen Standardabweichungen in kleinen Konzentrationsbereichen funktionstüchtig ist, wurden weitere Kalibriergeraden (siehe Abbildungen 3.1.42 und 3.1.43) erstellt. Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 12,5 µM bis 200 µM erstellt. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung der Messwerte. Aufgrund eines Ausreißers beim Wert 12,5 µM wurden hier nur zwei Werte berücksichtigt. Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergeraden ist 0,9987. Die Kalibriergerade ist im Bereich von 12,5 µM bis 200 µM linear. Aus der Kalibriergeraden errechnen sich ein Wert für die Nachweisgrenze von 15,06 µM und ein Wert für die Bestimmungsgrenze von 45,17 µM.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine weitere Kalibriergerade in dem Bereich von 50 µM bis 600 µM erstellt.

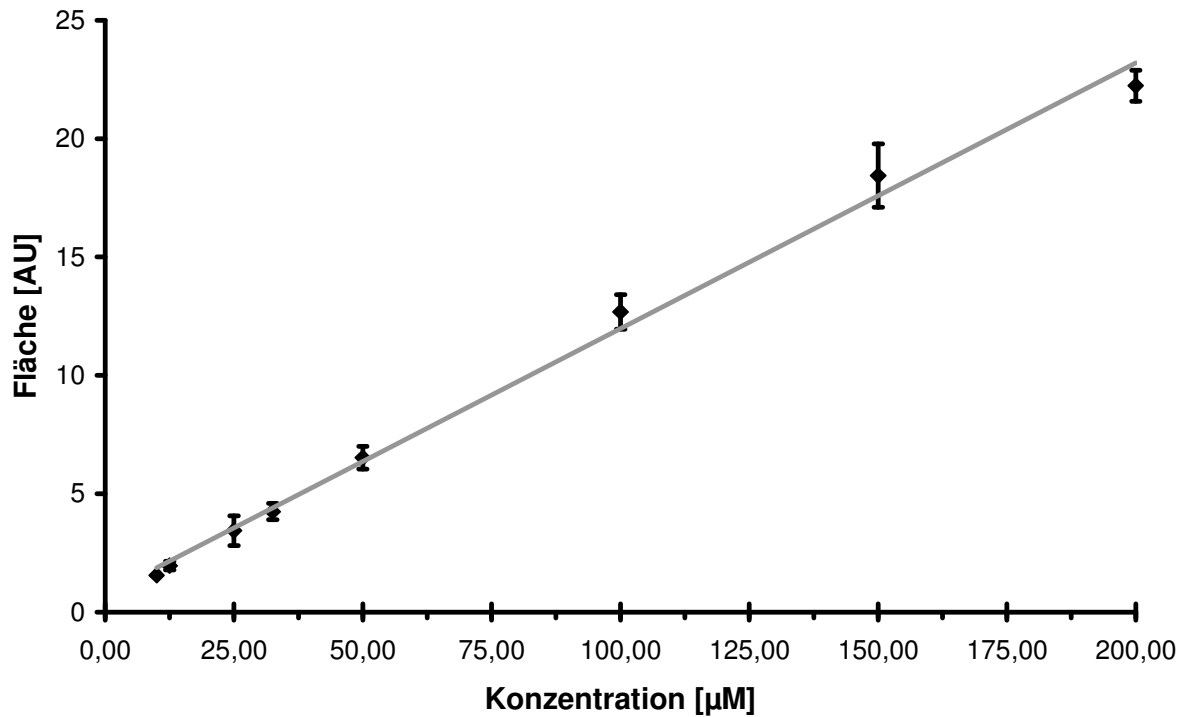


Abbildung 3.1.42 Sieben-Punkt-Kalibriergerade für Hydrochinon
Messpunkte zwischen 12,5 µM und 200 µM; Dreifachbestimmungen aller Messpunkte; GC-Elektrode; Potential E= 280 mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

In Abbildung 3.1.43 ist die Fünf-Punkt-Kalibriergerade dargestellt. Aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse und der damit bewiesenen Robustheit des Systems wurde hier, wie im Produktiveinsatz üblich, eine Einfachbestimmung der einzelnen Werte durchgeführt. Die Linearität der Kalibriergeraden ist mit einem Korrelationskoeffizient von 0,9988 gegeben.

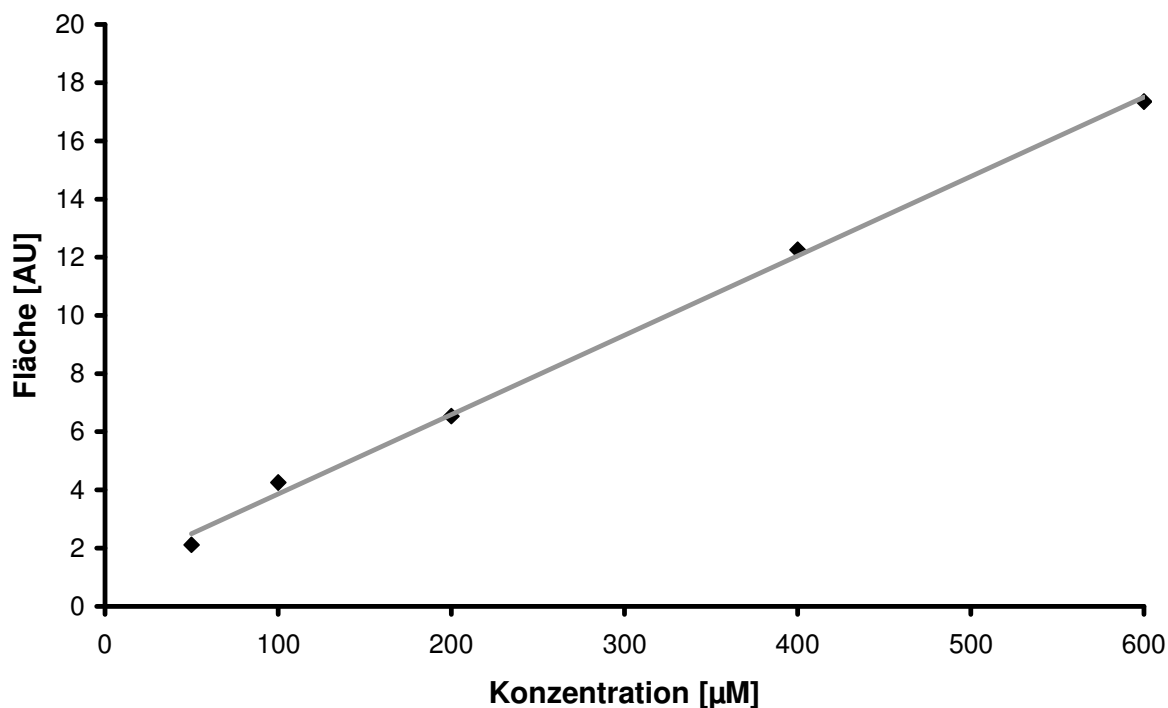


Abbildung 3.1.43 Fünf-Punkt-Kalibriergerade für Hydrochinon
 Messpunkte: 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM und 600 µM; GC-Elektrode;
 Potential $E = 280$ mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

Für diese Fünf-Punkt-Kalibrierung wurde erneut die Nachweis- und Bestimmungsgrenze berechnet. Es ist eine Nachweisgrenze von 36,71 µM und eine Bestimmungsgrenze von 110,13 µM ermittelt worden.

3.1.4.12.2 *Quantitative Bestimmung von 1,2-Dihydroxybenzen*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Bestimmungen von Hydrochinon robust sind und sich Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen chemisch nur in der Position einer Hydroxygruppe unterscheiden, wurde für 1,2-Dihydroxybenzen direkt eine einfache Sechspunkt-Kalibrierung durchgeführt (siehe Abbildung 3.1.44). Der Korrelationskoeffizient der Geraden ist 0,9993. Die Gerade ist im Messbereich von 100 µM bis 1000 µM linear. Die Nachweisgrenze beträgt 40,04 µM und die Bestimmungsgrenze 120,12 µM.

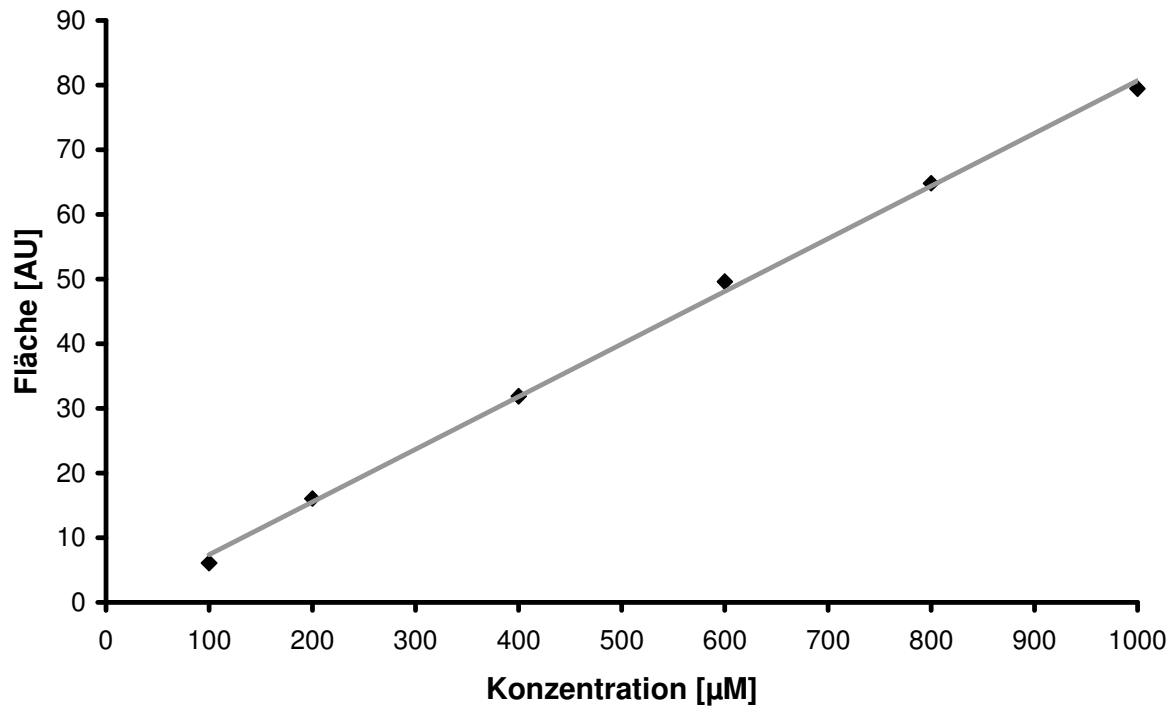


Abbildung 3.1.44 Sechspunkt-Kalibriergerade für 1,2-Dihydroxybenzen
Messpunkte zwischen 100 µM und 1000 µM; Einfachbestimmungen aller Messpunkte; GC-Elektrode; Potential E= 280 mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

3.1.4.12.3 *Quantitative Bestimmung von Gallussäure*

Die Berechnung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze erfolgt über eine Sechspunkt-Kalibriergeraden (Abbildung 3.1.45). Die Messpunkte sind dreifach bestimmt worden. Die Messung erfolgte in einem Bereich zwischen 0,125 mM und 2,000 mM. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9972. Aus der Messreihe ergeben sich eine Nachweisgrenze von 0,28 mM und eine Bestimmungsgrenze von 0,86 mM.

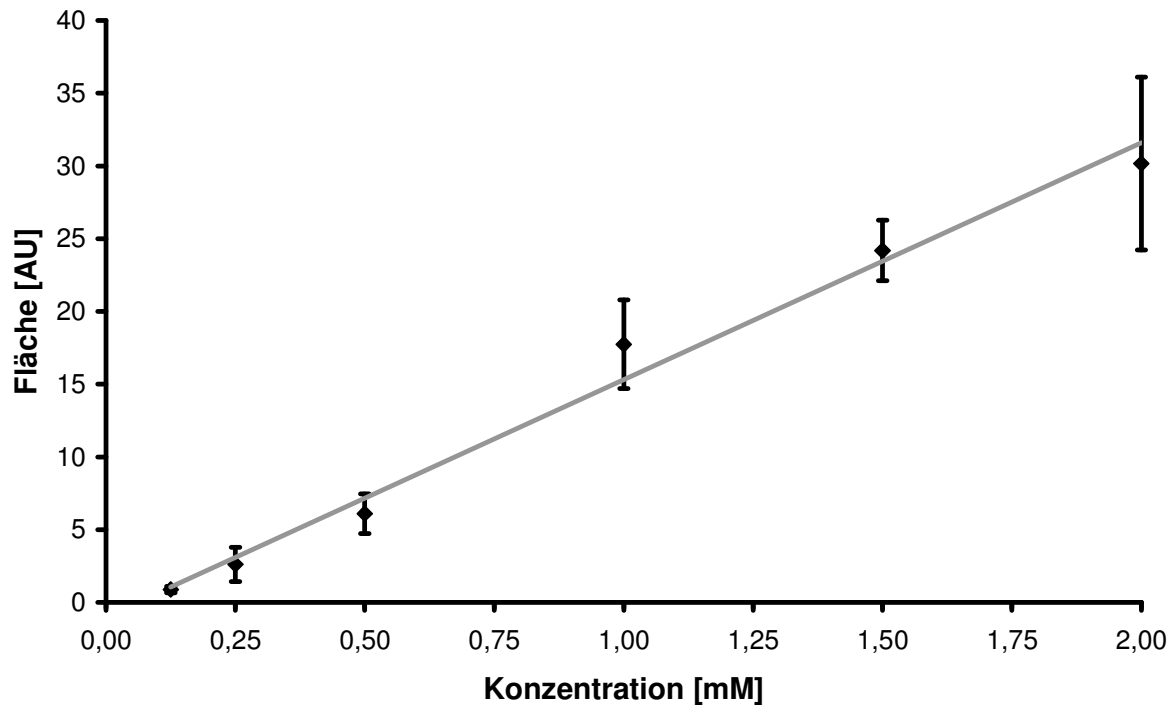


Abbildung 3.1.45 Sechs-Punkt-Kalibriergerade für Gallussäure
 Messpunkte: 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 1,000 mM, 1,500 mM und 2,000 mM; GC-Elektrode; Potential $E = 280$ mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

3.1.4.12.4 *Quantitative Bestimmung von Kaffeesäure*

Es wurde eine Sechs-Punkt Kalibrierung für Kaffeesäure im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 mM und 10 mM erstellt (Abbildung 3.1.46). Es erfolgte eine Dreifach-Bestimmung. Aufgrund eines Ausreißers erfolgte die Berechnung nur mit zwei Werten für die Bestimmung von 10,0 mM.

Die Gerade hat einen Korrelationskoeffizienten von 0,9973.

Die Nachweisgrenze hat einen Wert von 1,30 mM und die Bestimmungsgrenze hat einen Wert von 3,98 mM. Auffällig ist die große Standardabweichung bei den Werten 2,5 mM, 7,5 mM und 10,0 mM im Vergleich zu den anderen Werten.

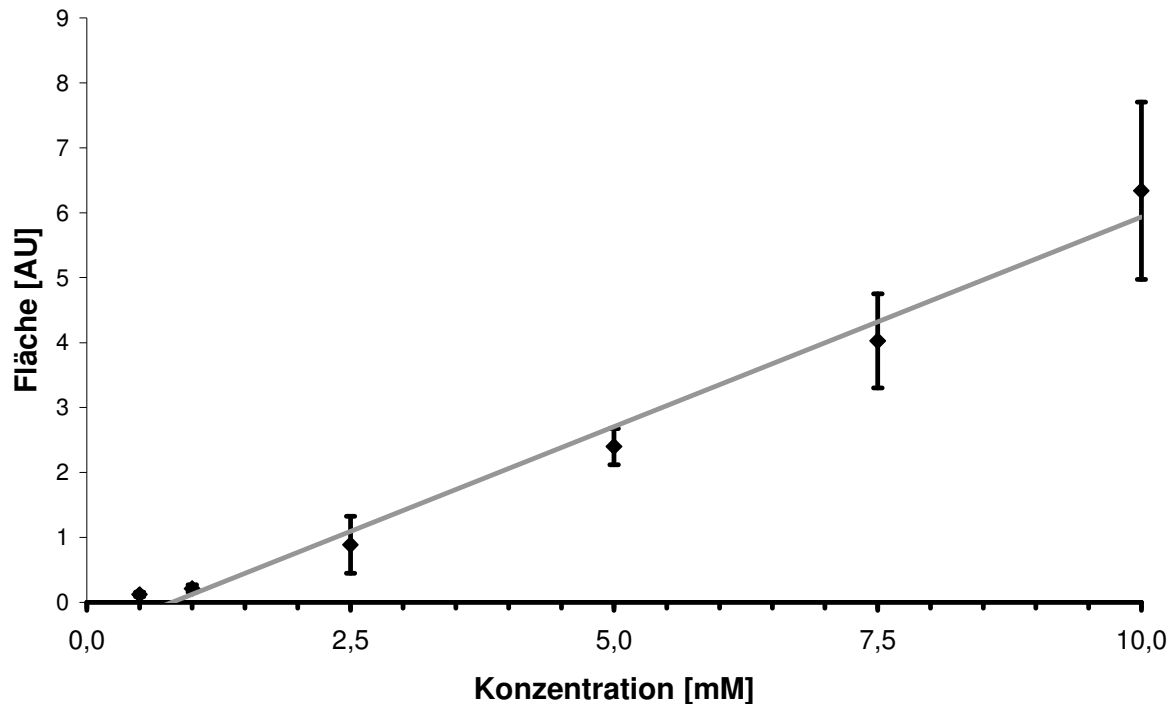


Abbildung 3.1.46 Kalibriergerade für Kaffeesäure in dem Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 10 mM
GC-Elektrode; Potential $E = 280$ mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

3.1.4.12.5 *Quantitative Bestimmung von DL-DOPA*

Die veränderten Parameter (Zusammensetzung des Puffers, Zusammensetzung der PLA-Paste) brachten nicht den gewünschten Erfolg bei der Bestimmung von DL-DOPA. Es war nicht möglich, Werte in guter Übereinstimmung doppelt bzw. dreifach zu vermessen. Des Weiteren war die Linearität der Messergebnisse nur in einem kleinen Bereich von 0,5 mM bis 2,0 mM gegeben.

Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergeraden (siehe Abbildung 3.1.47) beträgt in dem Bereich von 0,5 mM bis 2,0 mM 0,9916. Da bei dieser Messreihe ein hohes Grundrauschen vorhanden war, wurde auf eine Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze verzichtet. Stattdessen wurde eine zweite Messreihe in einem Bereich von 0,5 mM bis 1,5 mM vermessen (siehe Abbildung 3.1.48). Dabei handelt es sich um eine Fünf-Punkt-Kalibrierung, die wieder nur einfach bestimmt worden ist.

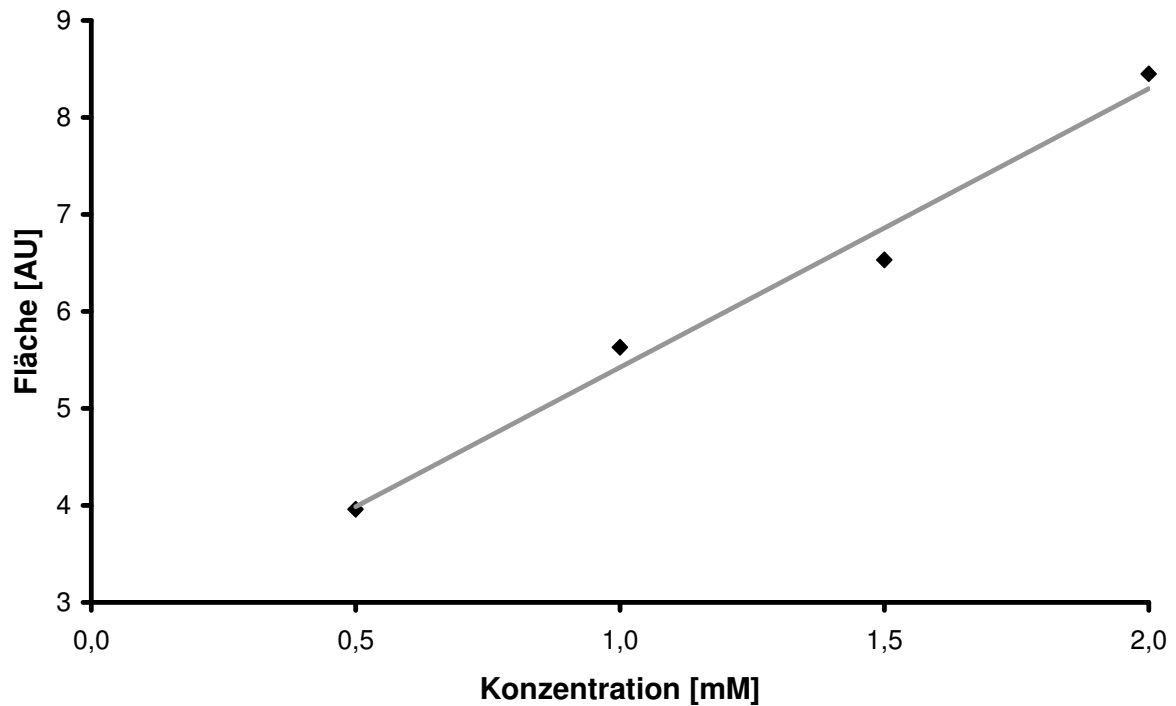


Abbildung 3.1.47 Kalibriergerade für DL-DOPA in dem Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 2 mM
GC-Elektrode; Potential $E = 280$ mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

Die Gerade hat einen Korrelationskoeffizienten von 0,9959 und ist somit in dem vermessenen Bereich linear. Im Vergleich zur ersten Messreihe sind die Signale deutlich kleiner, jedoch ist auch das Grundrauschen deutlich geringer.

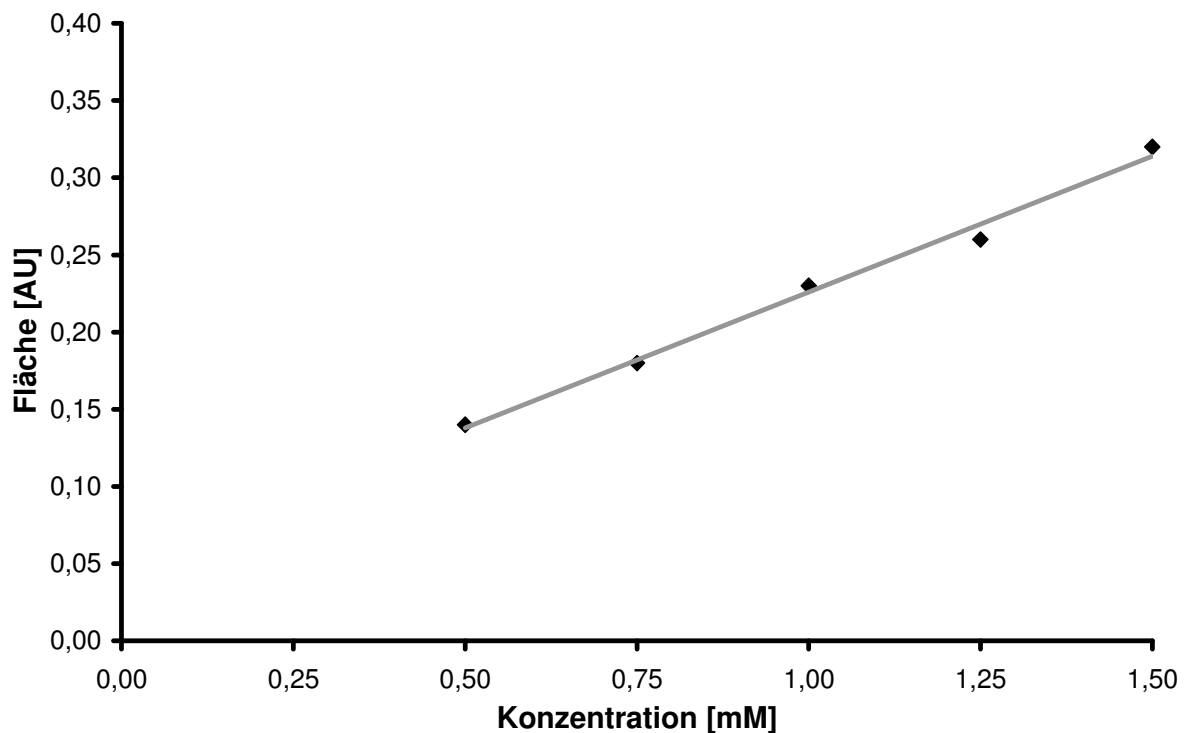


Abbildung 3.1.48 Kalibriergerade für DL-DOPA in dem Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 1,5 mM
GC-Elektrode; Potential $E = 280$ mV; Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7, NaCl 0,1 M

Deshalb wurde für diese Kalibriergerade eine Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze errechnet. Die Nachweisgrenze für DL-DOPA beträgt 0,32 mM und die Bestimmungsgrenze beträgt 0,80 mM.

3.1.4.13 Lagerstabilität

Die Lagerstabilität der PLA-beschichteten Elektrode wurde mittels Steigung einzelner Hydrochinon-Kalibriergeraden ermittelt. Die Steigung einer Kalibriergeraden korreliert direkt mit der Empfindlichkeit des Messsystems, eine große Steigung entspricht einer hohen Empfindlichkeit und eine geringe Steigung einer geringeren Empfindlichkeit.

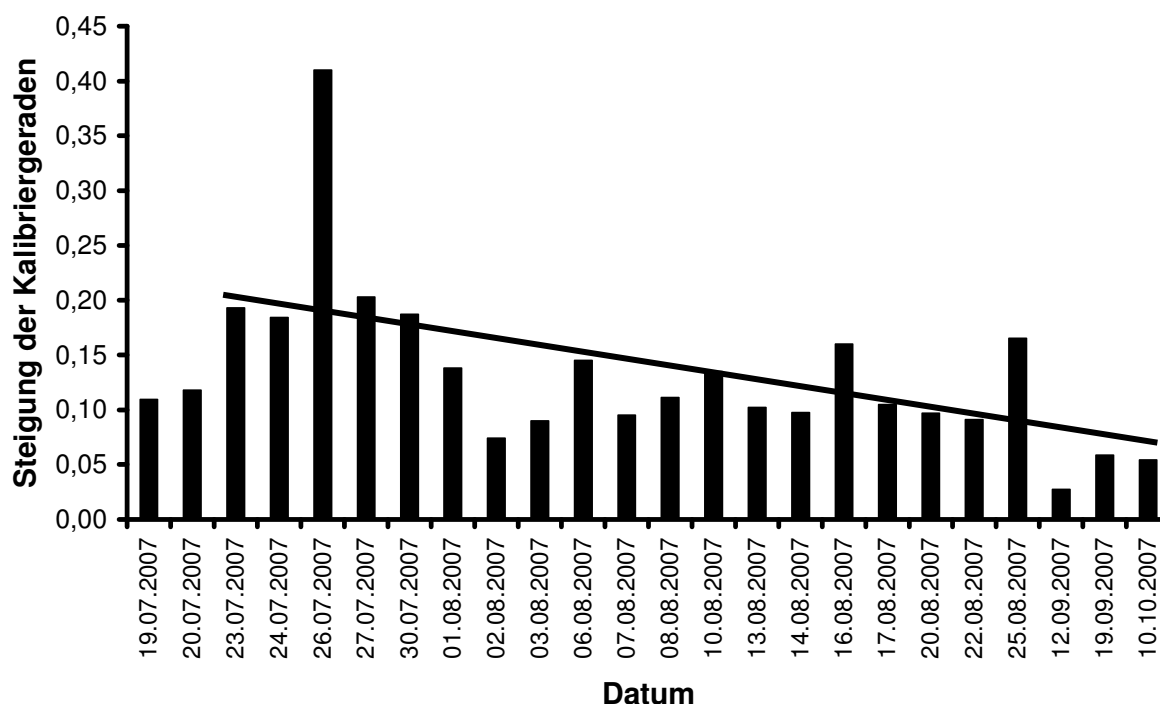


Abbildung 3.1.49 Lagerstabilität einer PLA-beschichteten GC-Elektrode
Zeitraum: vom 19.07.07 bis zum 10.10.07 (83 Tage); Es wurden zur Bestimmung der Lagerstabilität die Steigung verschiedener Hydrochinon-Kalibriergeraden herangezogen. Die Elektrode wurde bei +4°C gelagert. Die schwarze Gerade zeigt die Tendenz der Steigung.

Obwohl es zum Teil deutliche Ausreißer gibt (z.B. am 26.07.07), ist die Tendenz eindeutig zu erkennen, dass die Steigung und damit die Signalempfindlichkeit abnimmt. Eine weitere Ausnahme stellen die ersten beiden Tage nach der Immobilisierung des Enzyms auf der Elektrode dar, an denen die Steigung deutlich niedriger ist als an den darauffolgenden Messungen.

3.1.5 Amperometrische Detektion von Polyphenolen mittels des Enzyms Glucoseoxidase

Glucose, Glucoseoxidase und NADH (als Co-Enzym) dienen als Puffersystem, um Polyphenole zu reduzieren. Die reduzierte Form eines Polyphenols reagiert mit Glucose und Glucoseoxidase/FAD zur oxidierten Form des Polyphenols, Gluconolacton und Glucoseoxidase/FADH₂ (siehe Abbildung 3.1.50). Dies führt zu einem Kreislauf, indem das Signal amplifiziert wird [Vlcková et al., 2005]. Um ein anderes Enzym-System einsetzen zu können, welches evtl. stabiler und robuster als das ursprüngliche System mit Laccase ist, wurden deshalb auch Tests mit Glucoseoxidase durchgeführt.

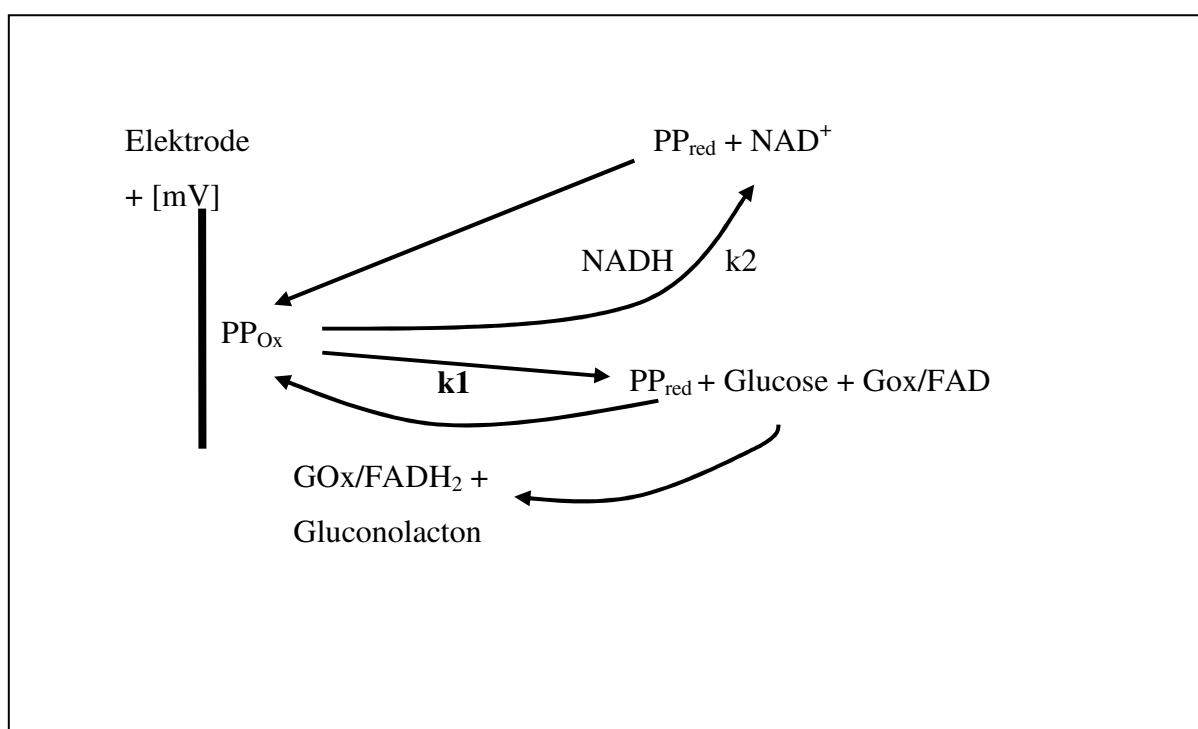


Abbildung 3.1.50 Schematische Darstellung der cyclischen Oxidation eines Polyphenols (PP) an einer Elektrode in zwei unabhängigen Enzymsystemen: NADH und Glucose/Glucoseoxidase (Gox); red = reduziert, Ox = oxidiert

3.1.5.1 Test von Hydrochinon in TRIS-Puffer

Das Enzym Glucoseoxidase hat ein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 7. Um diesen pH-Wert während den Messungen zu konstant zu halten, wurde ein TRIS-Puffer (TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) als Fließmittel verwendet. Um eventuelle Störungen bei dem verwendeten Puffer auszuschließen, wurden erste Messungen ohne Enzym durchgeführt. Dadurch können durch den Puffer verursachten Störungen im elektrochemischen System festgestellt werden. Wie in Abbildung 3.1.51 zu erkennen ist, sind die erhaltenen Signalpeaks nicht identisch. Während der Peak der ersten Messung einer 10 mM Hydrochinon-Lösung am

Signalmaximum steil abfällt, fällt der Peak der zweiten Messung einer 10 mM Hydrochinon-Lösung erst nach dem Signalmaximum steil ab. Es ist außerdem erkennbar, dass der zweite Peak mit einer Fläche von 1339 Einheiten größer ist als der erste Peak mit einer Fläche von 1216 Einheiten. Da keine biologische Komponente verwendet worden ist, wurde dies nicht so erwartet. Ohne Störeinflüsse sollte es zu gleich großen Signalen der elektrochemischen Komponente kommen.

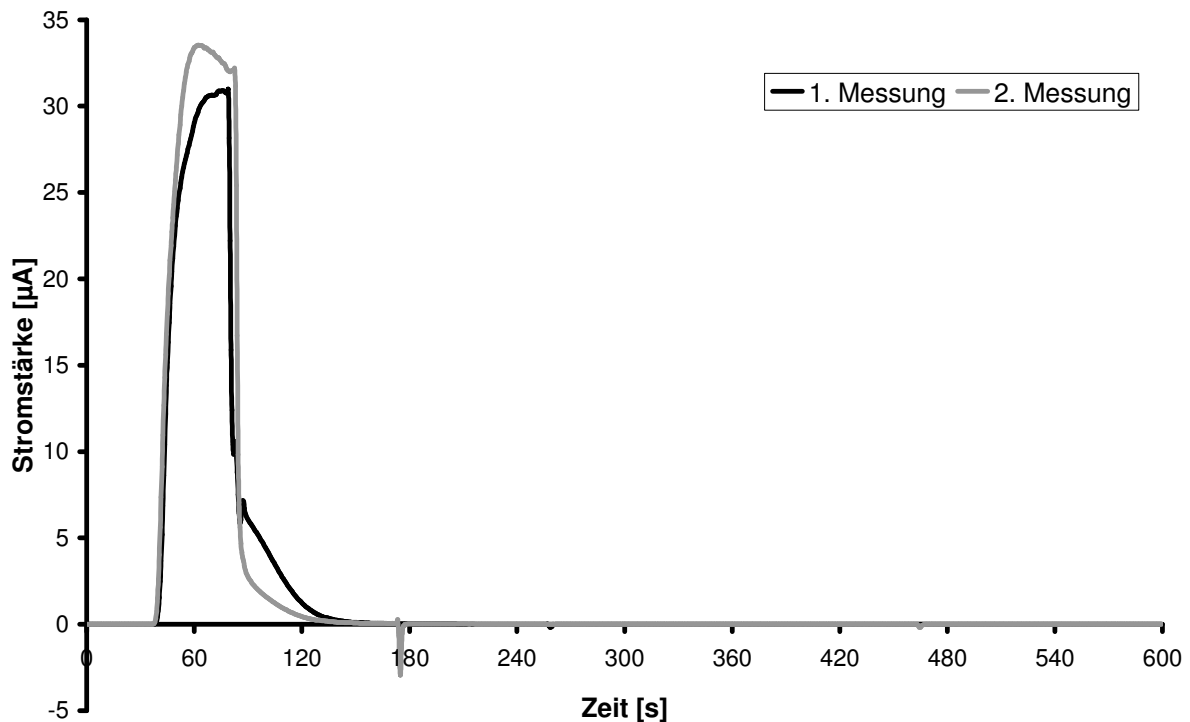


Abbildung 3.1.51 Messung einer 10 mM Hydrochinon-Lösung
Fließmittel: TRIS-Puffer 0,1 M, pH 7, Potential $E = 280$ mV, GC-Elektrode

3.1.5.2 Tests mit immobilisierter Glucoseoxidase auf GC-Elektroden.

Zuerst wurde das bestehende Setup der FIA beibehalten und das Enzym Laccase gegen das Enzym Glucoseoxidase ausgetauscht.

Um im pH-Optimum des Enzyms zu arbeiten, wurden anstelle des Citrat-Puffers TRIS-Puffer mit einem pH-Wert von sieben verwendet. Für die ersten Tests wurde ein Potential von 280 mV beibehalten. Man erkennt in Abbildung 3.1.52 einen sehr breiten Peak, der wiederum ein Tailing aufweist. Im Vergleich zu laccasendotierten Beschichtungen, die einen steilen Anstieg aufweisen, ist der Anstieg hier relativ flach.

Da schon bei Messungen ohne Enzymsystem die ermittelten Werte um ca. 10 % abweichen, die Peakgeometrie des Enzymsystems nicht eine Verbesserung erkennen lässt (größere Trägheit des Systems, was sich aus dem Fronting und Tailing ergibt) und ein das System

insgesamt komplexer geworden ist ohne eine deutliche Verbesserung, wurden keine weiteren Versuche mit dem System Glucoseoxidase/Glucose/Polyphenol durchgeführt.

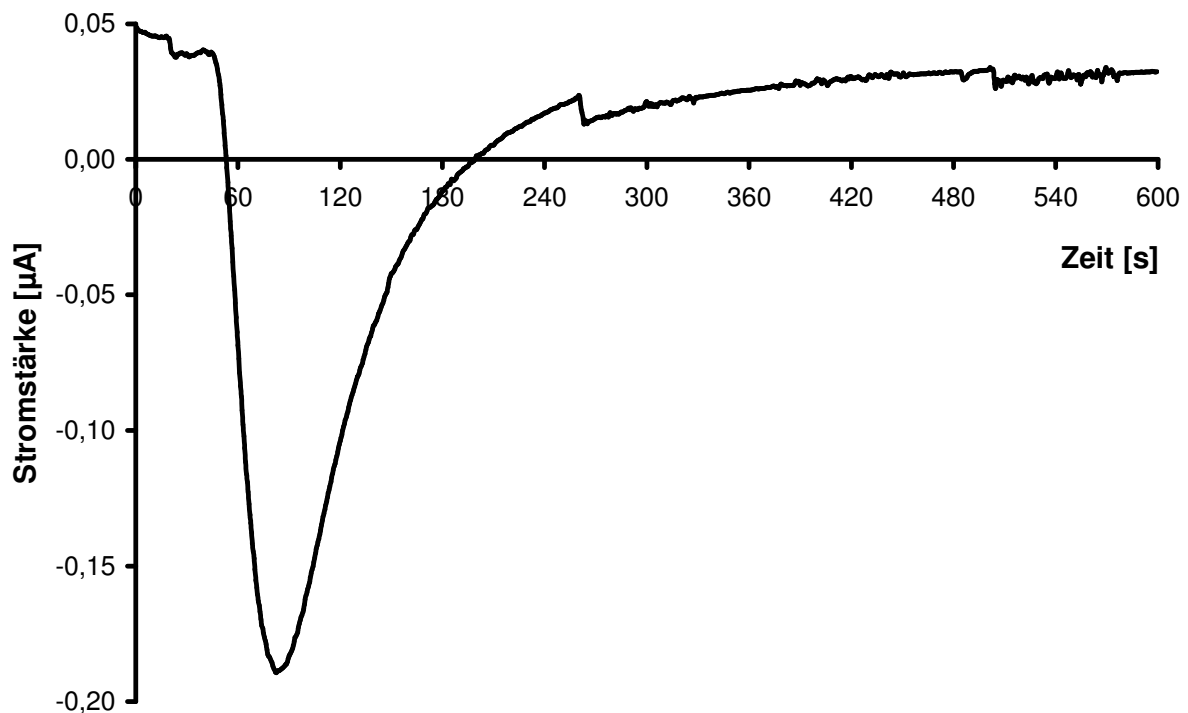


Abbildung 3.1.52 Messung einer 10 mM Hydrochinon-Lösung mit einer GC-Elektrode
Beschichtung mit immobilisierter Glucoseoxidase; Fließmittel: TRIS-Puffer 0,1 M pH 7;
Potential: 280 mV

3.2 TFT-Sensoren mit PLA-Beschichtung

Es wurde versucht, die Beschichtungsstrategie für die Makroelektroden auch auf die TFT-Sensoren anzuwenden. Dabei wurde auf die Erkenntnisse, die mit den Makroelektroden erhalten worden sind, zurückgegriffen.

Das größte Problem bei der Übertragung der Methode, die für die Makroelektroden verwendet worden ist, war das Aufbringen der PLA/Laccase-Paste auf der Arbeitselektrode der BVT-Sensoren. Der Durchmesser der Arbeitselektrode auf dem Sensor betrug nur 1 mm. Der Abstand zwischen der Arbeitselektrode und der Hilfselektrode betrug weniger als 1 mm. War die PLA-Paste zu viskos, so konnte man sie zwar auf der Arbeitselektrode positionieren, jedoch bildeten sich durch das verdampfende Dichlormethan Blasen. Dieser Effekt konnte auch nicht durch Temperaturabsenkung, um ein langsames Abdampfen des Dichlormethans zu ermöglichen, verhindert werden.

War die PLA-Paste noch zu dünnflüssig, so verlief die Paste auf den Sensoren und bedeckte nicht nur die Arbeitselektrode, sondern stellte einen Kontakt zur Hilfselektrode her, so dass diese Sensoren nicht mehr für Messungen geeignet waren.

Ein verlaufen der PLA-Paste konnte jedoch verhindert werden, indem man kleinste Mengen der PLA-Paste verwendete.

3.2.1 Cyclische Voltammetrie

Zur cyclischen Voltammetrie kamen sowohl BVT-Sensoren des Typs AC1.W4.R1 wie auch AC1.W5.R1 zum Einsatz. Ein cyclisches Voltammogramm ist in Abbildung 3.2.1 dargestellt. Die Messung erfolgte mit einer 1 mM Hydrochinon-Pufferlösung. Es wurde eine Scanrate von 0,1 V/s verwendet. Erwartet wurde ein Signal bei positivem Potential. In diesem Bereich ist kein Signal zu erkennen. Die Verwendung des Sensors AC1.W4.R1 brachte keinen Unterschied zum unten dargestellten Voltammogramm.

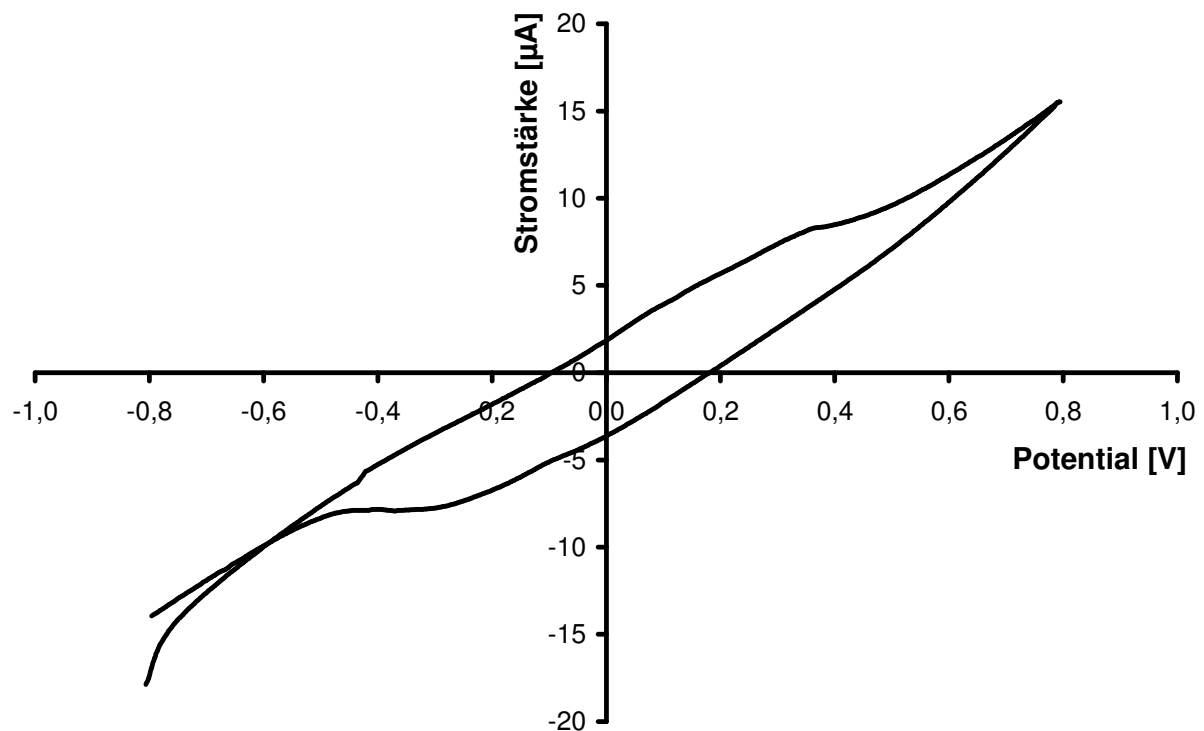


Abbildung 3.2.1 Cyclisches Voltammogramm

Probe: 1 mM Hydrochinon in Citrat-Puffer III pH 5,0; Scanrate 0,1 V/s; Messbereich -0,8 V bis 0,8 V; Sensor AC1.W5.R1; Arbeitselektrode mit Laccase/PLA-Paste beschichtet.

Eine hohe Scanrate kann dazu führen, dass der Scan schneller durchgeführt wird, als die Elektroden-Reaktionen stattfinden. Deshalb wurde ein weiteres cyclisches Voltammogramm erstellt mit einer Scanrate von 0,01 V/s (Abbildung 3.2.2).

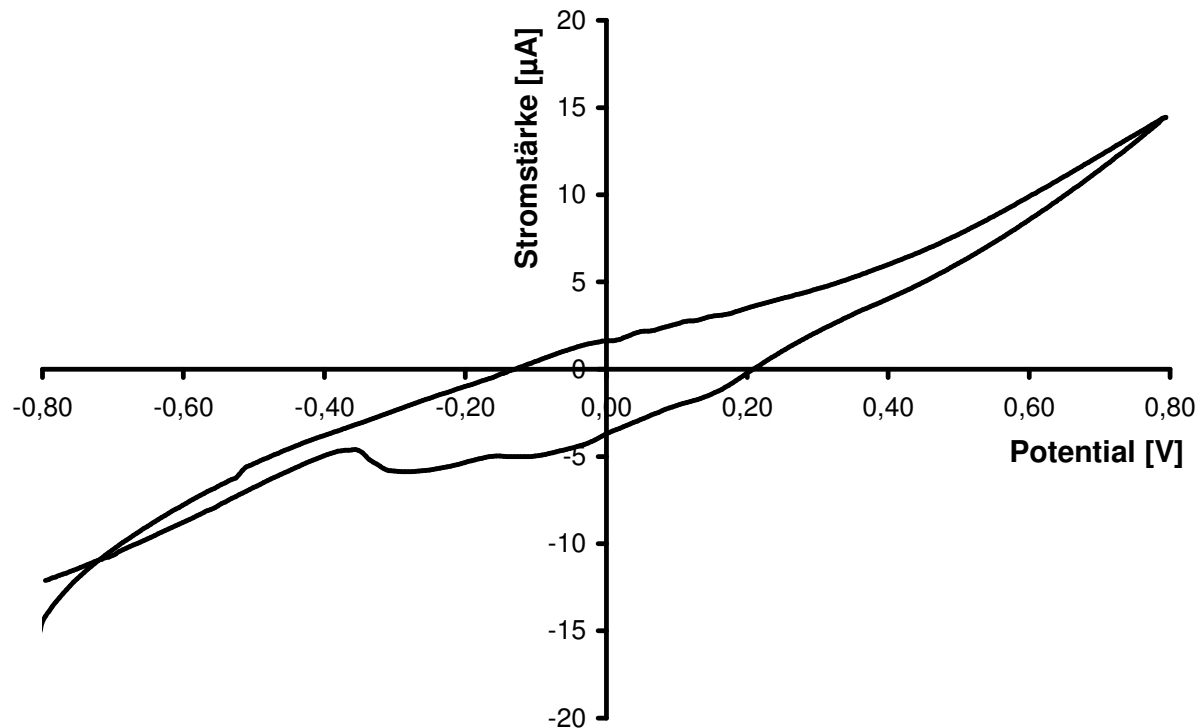


Abbildung 3.2.2 Cyclisches Voltammogramm

Probe: 1 mM Hydrochinon in Citrat-Puffer III pH 5,0; Scanrate 0,01 V/s; Messbereich -0,8 V bis 0,8 V; Sensor AC1.W5.R1; Arbeitselektrode mit Laccase/PLA-Paste beschichtet.

Da diese Ergebnisse keine Aussagen über das Arbeitspotential zulassen, wurde ein weiteres Mal ein cyclisches Voltammogramm aufgenommen. Um auszuschließen, dass die Konzentration der verwendeten Hydrochinon-Lösung nicht zu gering für eine Messung war, wurde bei einer weiteren Messreihe die Konzentration des Hydrochinons auf 10 mM erhöht. Die Scanrate wurde nicht verändert und betrug 0,01 V/s. Wie in Abbildung 3.2.3 dargestellt, brachte auch die Erhöhung der Hydrochinon-Konzentration um den Faktor 10 kein auswertbares Voltammogramm. Da die cyclische Voltammetrie mit den BVT-Sensoren AC1.W4.R1 und AC1.W5.R1 keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, wurde auf weitere Tests verzichtet.

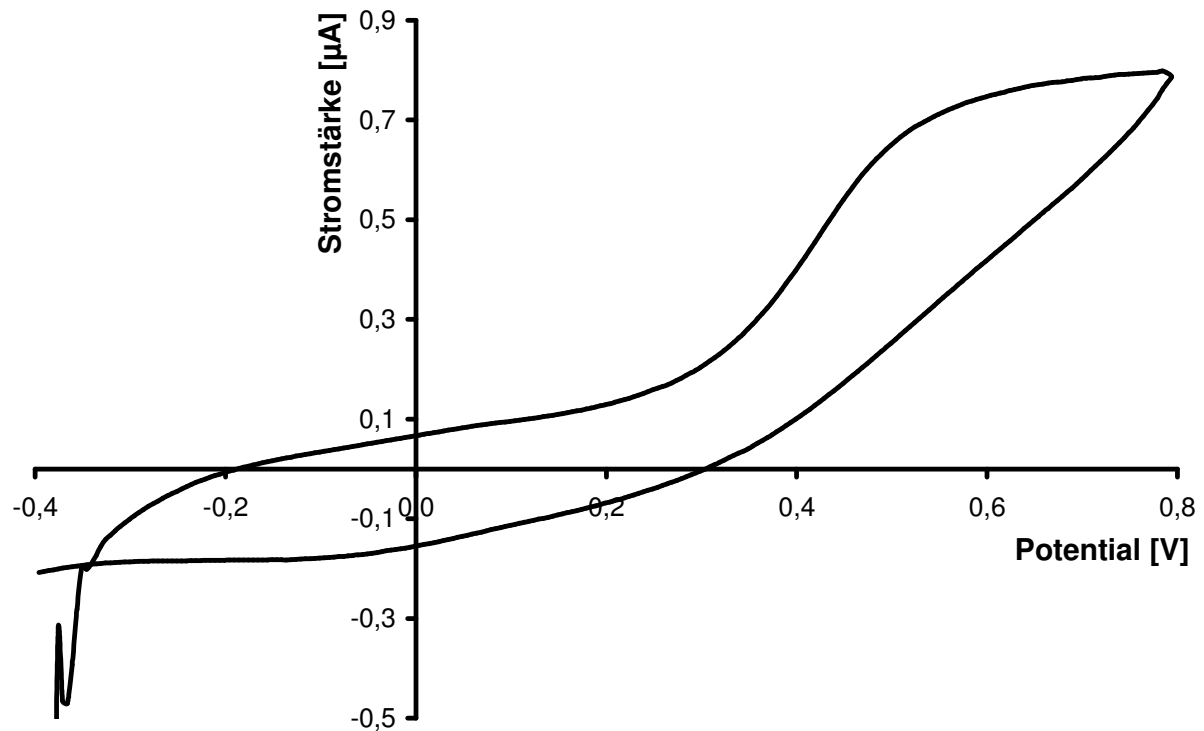


Abbildung 3.2.3 Cyclisches Voltammogramm

Probe: 10 mM Hydrochinon in Citrat-Puffer III pH 5,0; Scanrate 0,01 V/s; Messbereich -0,4 V bis 0,8 V; Sensor AC1.W4.R1; Arbeitselektrode mit Laccase/PLA-Paste beschichtet.

3.2.2 Amperometrie

Obwohl das cyclische Voltammogramm keine Aussage über das Potentialoptimum liefert, wurden amperometrische Messungen mit BVT-Sensoren durchgeführt. Das Potential wurde auf 280 mV eingestellt, das Optimum, das für die Makroelektrode ermittelt worden ist. Die ersten Messungen mit BVT-Sensoren wurden nicht im Durchfluss gemessen, sondern durch Eintauchen in verschiedenen Lösungen.

Auch hier kamen sowohl Sensoren des Typs AC1.W4.R1 wie auch Sensoren des Typs AC1.W5.R1 zum Einsatz.

In Abbildung 3.2.4 ist eine Messung dargestellt, bei der der Sensor in zwei verschiedene Lösungen getaucht wurde. Die Messung im Zeitraum von 0 s bis 1800 s fand in Citrat-Puffer III statt, in dem Zeitraum von 1800 s bis 3600 s wurde eine 1 mM Hydrochinon-Lösung (Puffer: Citrat-Puffer III) vermessen. Unter Berücksichtigung aller vorher erhaltenen Ergebnisse wurde nach dem Wechsel der Lösung ein Abfallen der Stromstärke gegenüber der Basislinie erwartet. Jedoch stieg die Stromstärke stark an und fiel dann leicht wieder ab (Bereich 1800 s- 2100 s). In dem Bereich von 2100 s bis 3600 s steigt das Signal wieder langsam an.

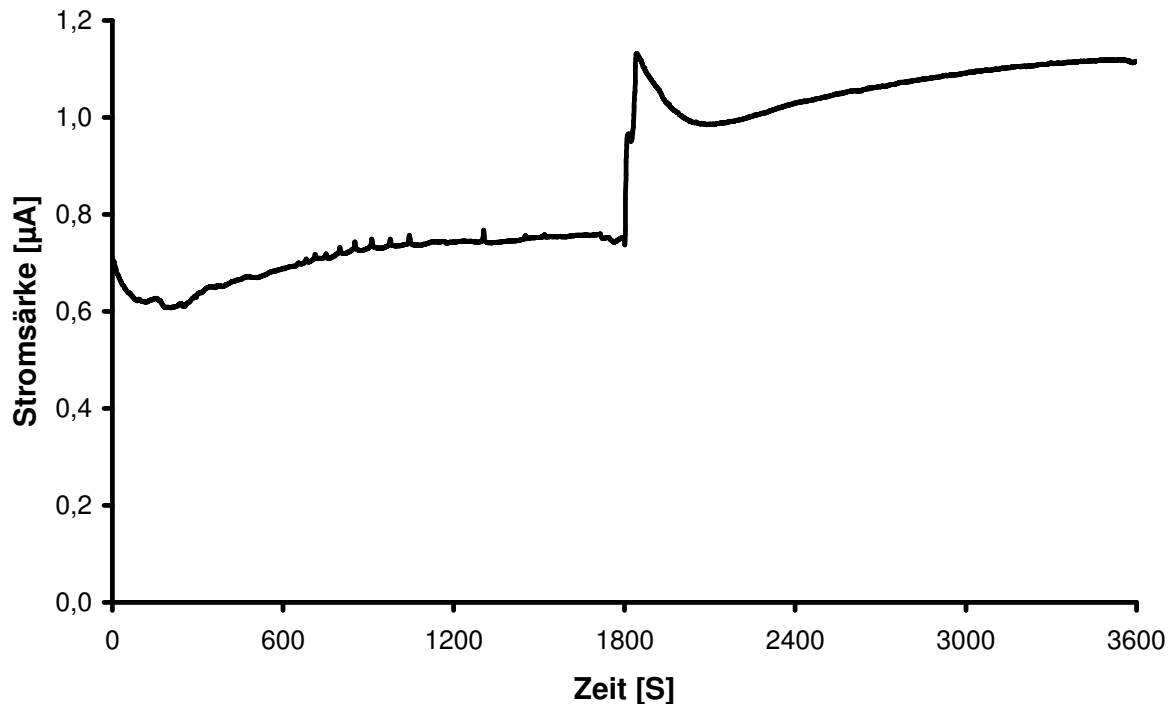


Abbildung 3.2.4 Messung mit Sensor-Typ AC1.W5.R1
 0 s – 1800 s: Citrat-Puffer III; 1800 s – 3600 s 1 mM Hydrochinon-Lösung in Citrat-Puffer III

Aufgrund der nicht erfolgreichen Messungen mit den Standard-PLA-Parametern, wurde eine neue PLA-Zusammensetzung getestet. Dabei wurde die Menge an PLA von 125 mg auf 75 mg gesenkt. Dies hatte zum einen eine geringere Viskosität der Paste zu Folge, zum Anderen ein besseres Abdampfverhalten des Dichlormethans aus der Paste heraus.

Die Messung mit der so veränderten PLA-Zusammensetzung ist in Abbildung 3.2.5 dargestellt. Dabei wurde der Sensor während der Messung in die unterschiedlichen Messlösungen getaucht.

In den ersten 600 s wurde der Sensor in Citrat-Puffer III vermessen, von 600 s – 1200 s wurde eine 1 mM Hydrochinon-Lösung vermessen, von 1200 s – 1800 s wurde eine 1 mM 1,2-Dihydroxybenzen-Lösung vermessen und von 1800 s – 2400 s wurde wieder Citrat-Puffer III vermessen.

Im Bereich der Hydrochinon-Lösung ist deutlich, wie erwartet, eine negative Signaländerung zu sehen. Jedoch steigt die Stromstärke nach dem Abfall wieder an.

Im Vergleich dazu sinkt das Signal bei der Messung der 1,2-Dihydroxybenzen-Lösung nicht so stark ab. Jedoch bleibt dieses Signal relativ stabil.

In der letzten Messphase steigt die Stromstärke wieder wie erwartet an, jedoch nicht auf den Wert der ersten Messphase, sondern die Stromstärke übersteigt den Wert der ersten Messphase noch.

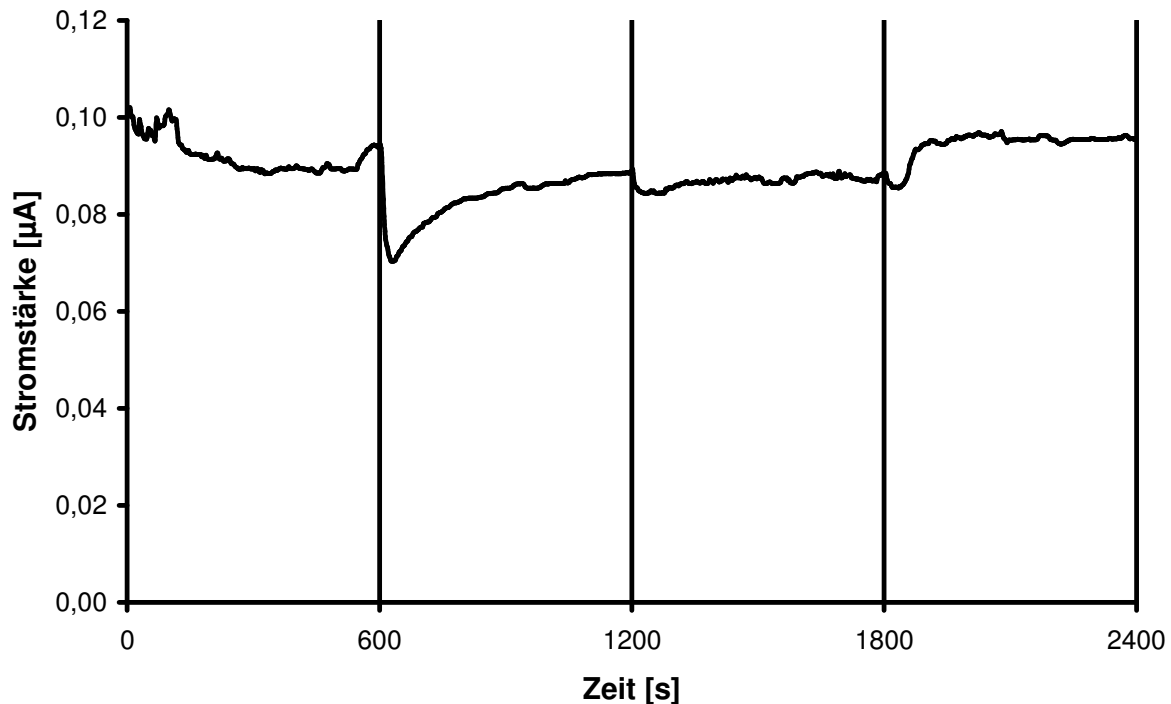


Abbildung 3.2.5 Messung mit Sensor-Typ AC1.W5.R1
0 s – 600 s: Citrat-Puffer III; 600 s – 1200 s: 1 mM Hydrochinon-Lösung in Citrat-Puffer III,
1200 s – 1800 s: 1 mM 1,2-Dihydroxybenzen-Lösung in Citrat-Puffer III; 1800 s – 2400 s:
Citrat-Puffer III

Da die unterschiedlichen Beschichtungsstrategien, PLA-Zusammensetzungen und Messanordnungen zu keinem Ergebnis führte, wurden die Tests mit PLA beschichteten TFT-Sensoren abgebrochen und anderen Immobilisierungsstrategien getestet.

3.3 Anderen Beschichtungsstrategien bei TFT-Sensoren

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Beschichtung von PLA auf die Arbeitselektroden der TFT-Sensoren wurden weitere Beschichtungsstrategien versucht. Dabei wurden die Photolinker Sulfo-HSAB und FNPA eingesetzt, sowie das Beschichtungssystem APTES/GDA.

3.3.1 Vergleich der Beschichtungen APTES, Sulfo-HSAB und FNPA

Zum Vergleich der Beschichtungsstrategien wurde mit den unterschiedlichen TFT-Sensoren eine 2 mM-Hydrochinon-Lösung (Phosphat-Puffer III) vermessen.

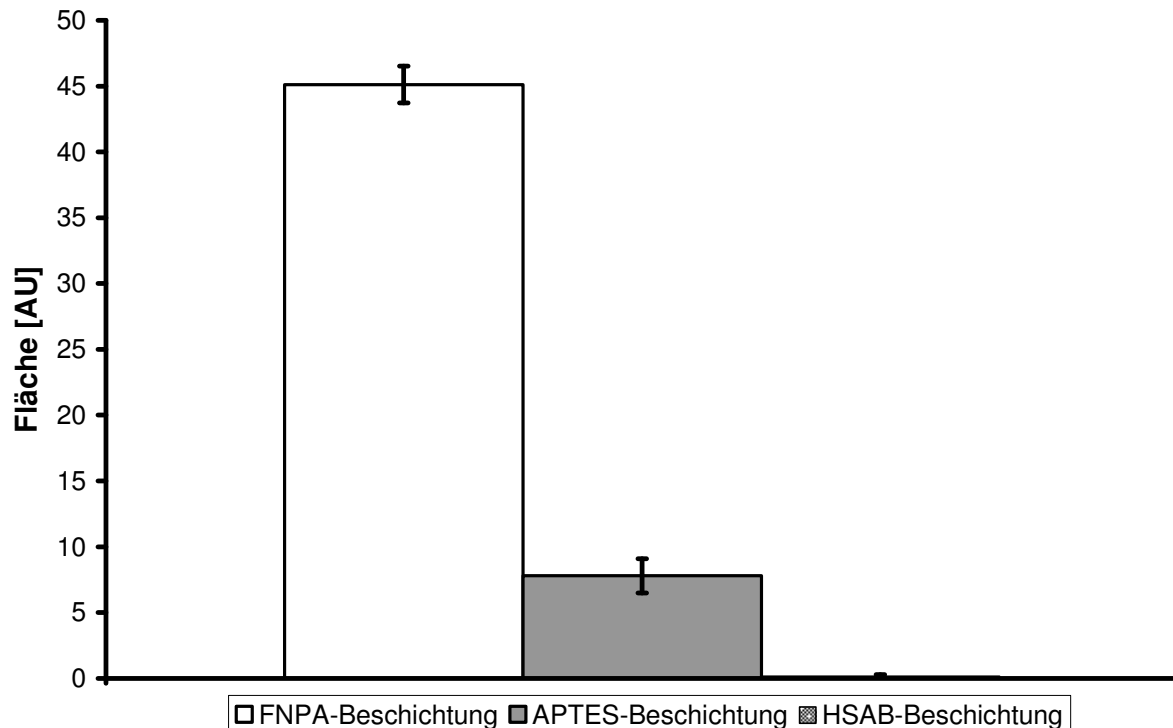


Abbildung 3.3.1 Vergleich von unterschiedlichen Beschichtungsstrategien
Die Auswertung erfolgte über die Fläche der Peaks. Es erfolgte eine Doppelbestimmung.

Die Auswertung erfolgte über die Fläche der erhaltenen Peaks in den Elektropherogrammen. Es ist in Abbildung 3.3.1 zu erkennen, dass die höchste Signalintensität die Elektroden erbrachten, deren Laccase mit FNPA beschichtet wurden. Die Signale sind mehr als fünfmal größer als die Signale der mit APTES beschichteten Elektroden. Die Signale der mit Sulfo-HSAB beschichteten Elektroden sind mit $0,19 \pm 0,11$ so gering, dass sie in Abbildung 3.3.1 nicht mehr deutlich dargestellt werden können.

3.3.2 Beschichtung mit FNPA

Die Beschichtungsstrategie für FNPA-Beschichtungen ist in Kapitel 2.3.11.2 beschrieben. Aufgrund der neuen Beschichtungsstrategie wurden alle Tests, die auch schon mit PLA durchgeführt worden sind, erneut durchgeführt.

3.3.2.1 Vergleich von verschiedenen Laccasen und BVT-Sensoren

Um das Messsystem optimal nutzen zu können, wurde ein Test durchgeführt, um zwei Parameter zu prüfen. Zum einen wurde geprüft, welche Arbeitselektrode der TFT-Sensoren für die Beschichtung mit FNPA am geeignetsten ist. Zum anderen wurde getestet, welche Laccase die höchste Aktivität nach Beschichtung mit FNPA besitzt. Dazu wurde der ABTS-Test verwendet.

Bei den verwendeten TFT-Sensoren handelt es sich um Sensoren der Firma BVT mit den Arbeitselektroden Platin (AC1.W2.R1) und Kohlenstoff (AC1.W4.R1 und AC1.W5.R1)

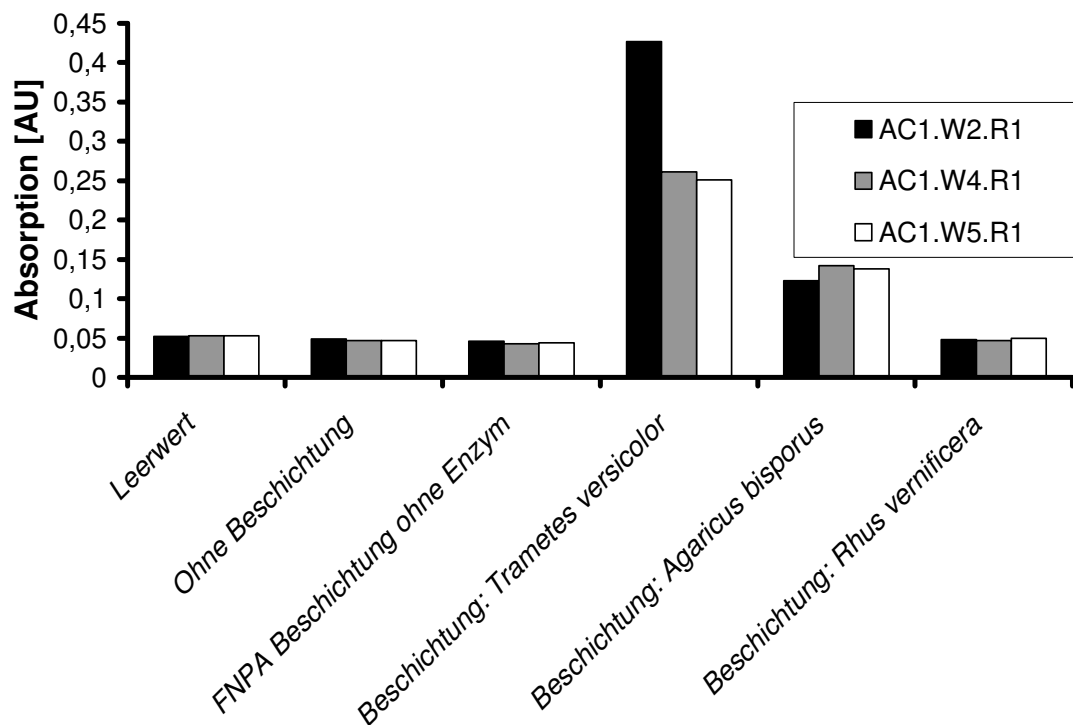


Abbildung 3.3.2 Vergleich von verschiedenen Laccasen auf unterschiedlichen BVT-Sensoren
 AC1.W2.R1: Platin-Arbeitselektrode; AC1.W4.R1 und AC1.W5.R1: Kohlenstoff-Arbeitselektroden; Die Kohlenstoffelektroden unterscheiden sich in der Kohlenstoff-Modifikation.

Die eingesetzten Laccasen stammen aus *Trametes versicolor* (30,6 U/mg), *Agaricus bisporus* (6,3 U/mg) und *Rhus vernificera* (120 U/mg). Wie man in Abbildung 3.3.2 erkennt, sind die Werte des Blindwertes, der Sensoren ohne Beschichtung und der mit FNPA behandelten Sensoren quasi identisch.

Vergleicht man die mit Enzym beschichteten Sensoren, so fällt auf, dass die Ergebnisse der mit Laccase aus *Rhus vernificera* beschichteten Elektroden keinen großen Unterschied zum Blindwert aufweisen. Die Absorptionen der mit Laccase aus *Agaricus bisporus* beschichteten Sensoren sind hingegen mehr als doppelt so groß wie die des Blindwertes. Die höchsten Absorptionen liefern die Sensoren, die mit Laccase aus *Trametes versicolor* beschichtet worden sind. Im Vergleich sind die Absorptionswerte für die Sensoren mit Kohlenstoffelektroden, die mit Laccase aus *Trametes versicolor* beschichtet worden sind doppelt so groß wie die Absorptionswerte der Sensoren, die mit Laccase aus *Agaricus bisporus* beschichtet worden sind. Es fällt darüber hinaus auf, dass der Sensor mit Platin-Arbeitselektrode, welcher mit Laccase aus *Trametes versicolor* beschichtet ist, die größte Absorption im Vergleich aller getesteten Systeme aufweist.

3.3.2.2 Verwendung von Glucoseoxidase

Obwohl die unter 3.1.4 ermittelten Ergebnisse für die Makroelektroden keinen Vorteil gegenüber dem Laccase-System erkennen ließen, wurde ein Langzeitversuch mit FNPA-immobilisierter Glucoseoxidase durchgeführt. Dabei wurde ein Zeitraum von 75 min gemessen (Abbildung 3.3.3).

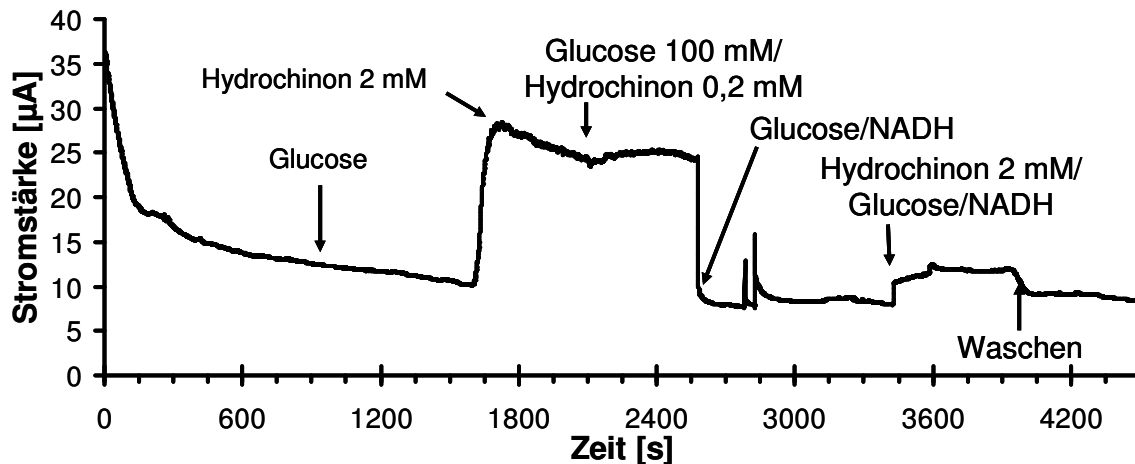


Abbildung 3.3.3 Messung einer 0,2 mM Hydrochin-Lösung mit einem Glucoseoxidase-System
Die ersten 15 Minuten wurden bis zur Einstellung eines stabilen Drifts auf eine Messung verzichtet. Fließmittel: Phosphat-Puffer 0,05 M, pH 7,0; Potential $E=800$ mV

Nach 15 Minuten (900 s) wurde eine 100 mM Glucose-Lösung vermessen, was aber zur keiner Signalveränderung führte. Von Minute 27 (1620 s) bis zu Minute 35 (2100 s) wurde eine 2 mM Hydrochinon-Lösung vermessen. Hier ist auffällig, dass sich kein stabiles Plateau ausbildet, sondern weiterhin ein Drift zu erkennen ist. Ab Minute 35 bis Minute 42 (2520 s) wurde eine Kombination aus 100 mM Glucose und 0,2 mM Hydrochinon vermessen. Im Vergleich zu vorher vermessenen 2 mM Hydrochinon-Lösung erhält man ein stabiles Plateau. Der nächste Messabschnitt beginnt bei Minute 42 bis zu Minute 57 (3420 s), bei der eine Mischung aus Glucose und NADH vermessen worden ist. Hier ist das Signal in Höhe der Basislinie. Vor dem letzten Schritt, einem Spülschritt, wurde von Minute 57 bis zu Minute 67 (4020 s) nochmals eine Mischung aus Glucose, NADH und 2 mM Hydrochinon vermessen. Man kann festhalten, dass sowohl Glucose und eine Kombination aus Glucose/NADH keinen signifikanten Einfluss auf das Messsystem hat, da die gemessene Stromstärke auf dem Niveau der Pufferlösungen liegt. Vergleicht man die vermessenen Lösungen „Hydrochinon 2 mM“ und „Glucose 100 mM /Hydrochinon 0,2 mM“ so stellt man fest, dass die Maxima der Stromstärken ähnlich hoch sind (28,43 μA für die Lösung „Hydrochinon 2 mM“ und 25,40 μA für die Lösung „Glucose 10 mM/Hydrochin 0,2 mM“). Dies deutet auf einer höheren Sensitivität des Systems bei Zugabe von Glucose hin. Dies wurde auch so erwartet. Im

Gegensatz dazu brachte die Zugabe von NADH zu einer Lösung von Glucose und Hydrochinon 2 mM keine Verbesserung, obwohl dies erwartet worden ist. Vergleicht man die Lösungen „Hydrochinon 2mM/Glucose/NADH“ (Maximum: 12,45 μA) mit den anderen beiden Lösungen, die Hydrochinon enthalten, so ist im Gegenteil noch festzustellen, dass das Signal deutlich kleiner ist (Faktor ca. 0,5 beim Vergleich der Peakmaxima der Lösungen „Hydrochinon 2mM/Glucose/NADH“ und „Glucose 10 mM/Hydrochin 0,2 mM“).

3.3.2.3 Cyclische Voltammetrie

Um das optimale Potential zur Messung von Hydrochinon zu bestimmen, wurde eine cyclische Voltammetrie eines TFT-Sensors mit Platin-Arbeits Elektrode durchgeführt. Als Beschichtung wurde die Laccase von *Trametes versicolor* verwendet, da sie die höchste Aktivität im gebundenen Zustand auf der Elektrode im Vergleich zu den anderen Laccasen hat (vergleiche auch Abbildung 3.3.2).

Die Messung erfolgte bei einer Scanrate von 1,0 V/s. Es wurden insgesamt fünf Messungen hintereinander durchgeführt. Wie man in Abbildung 3.3.4 erkennen kann, kann man die fünf Läufe in zwei Gruppen unterteilen. Der 1. Lauf und der 2. Lauf weisen einen ähnlichen Verlauf auf. Die Läufe 3 bis 5 sind identisch und überlagern sich gegenseitig. Während für die ersten beiden Läufe der Oxidations-Peak bei +630 mV liegt, liegt der Oxidations-Peak bei den restlichen Läufen bei +670 mV.

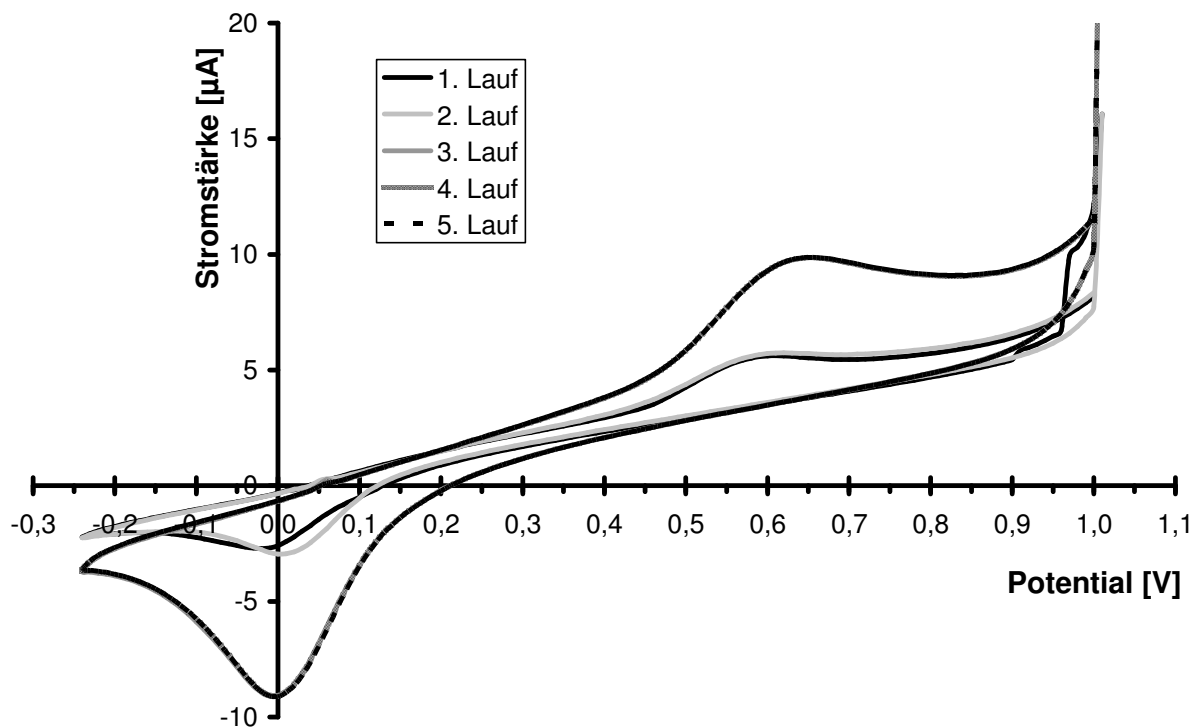


Abbildung 3.3.4 Cyclisches Voltammogramm einer 0,2 mM Hydrochinon-Lösung
Phosphat-Puffer III, BVT-Sensor AC1.W2.R1; Scanrate: 1,0000 V/s

Das Maximum des Reduktions-Peaks liegt bei allen Läufen bei 0,0 V, jedoch ist das Maximum des Reduktions-Peaks für die Läufe 3-5 deutlich ausgeprägter als bei den Läufen 1 und 2.

Die Verschiebung des Oxidations-Peaks von 630 mV nach 670 mV, welche mit einer deutlicheren Ausprägung des Maximums einhergeht, lässt vermuten, dass es sich um eine Überlagerung der Oxidation des Polyphenols und der Oxidation möglicher Folgeprodukte, die bei einem ähnlichen Potential oxidiert werden handelt.

3.3.2.4 Amperometrische Messungen von Referenzsubstanzen

Zum Testen des Messsystems mit immobilisiertem Enzym wurden die Referenzsubstanzen Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und Gallussäure verwendet. Alle drei Substanzen konnten vermessen werden, wenn auch in stark unterschiedlichen Konzentrationsbereichen.

3.3.2.4.1 Hydrochinon

Hydrochinon kann in einem Konzentrationsbereich von 10 μM bis hin zu 250 μM detektiert werden (Abbildung 3.3.5). In diesem Bereich wurde eine Neun-Punkt-Kalibriergerade in Dreifachbestimmung erstellt. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9994. Auffällig sind die großen Standardabweichungen im Konzentrationsbereich von 10 μM bis 50 μM . Berechnet man die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze für die Kalibriergerade nach DIN 32645, so erhält für die Nachweisgrenze einen Wert von 12,82 μM und für die Bestimmungsgrenze einen Wert von 43,13 μM . Damit liegen die Werte mit den großen Standardabweichungen unterhalb bzw. in der Nähe der Bestimmungsgrenze,

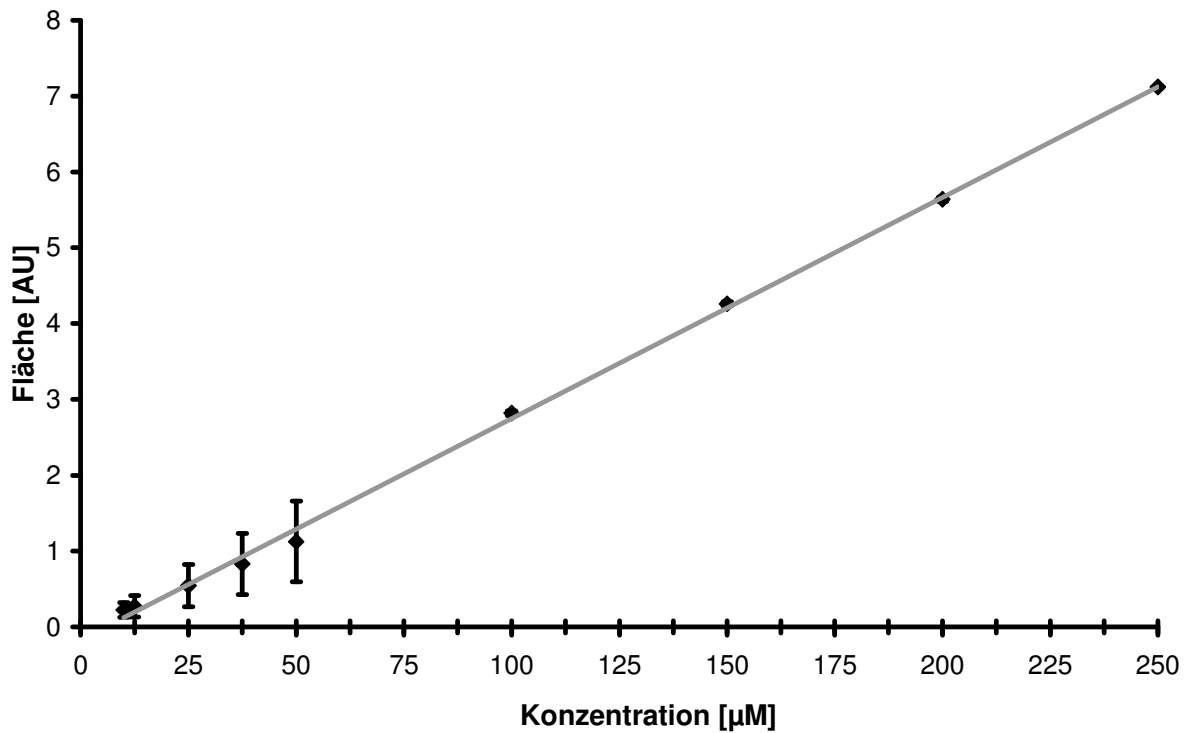


Abbildung 3.3.5 Bestimmung von Hydrochinon über die Flächen der Peaks
Puffer: Phosphat-Puffer III; Potential $E=670$ mV; Dreifachbestimmung,
Neun-Punkt-Kalibrierung

3.3.2.4.2 1,2-Dihydroxybenzen

1,2-Dihydroxybenzen kann im Bereich von 0,125 mM bis 5 mM linear vermessen werden (Abbildung 3.3.6). Für diesen Konzentrationsbereich lässt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,9998 berechnen.

Die Bestimmung der Kalibriergeraden erfolgte über eine Elf-Punkt-Kalibrierung in Dreifachbestimmung. Aus den Messwerten errechnet sich eine Nachweisgrenze von 9,33 µM und eine Bestimmungsgrenze von 34,26 µM.

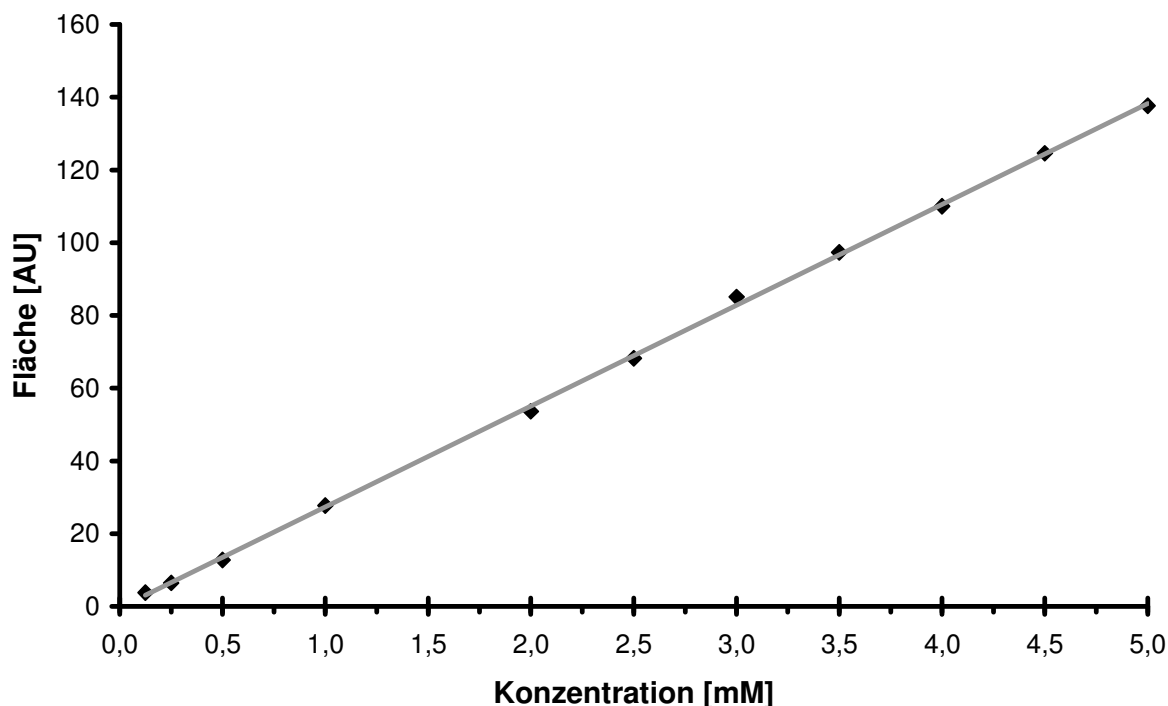


Abbildung 3.3.6 Bestimmung von 1,2-Dihydroxybenzen über die Peakflächen
 Puffer: Phosphat-Puffer III; Potential $E=670$ mV; Dreifachbestimmung,
 Elf-Punkt-Kalibrierung

3.3.2.4.3 Gallussäure

Während Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen per Injektion durch eine Probenschleife in das System eingebracht worden sind und in einer Durchflussmesszelle vermessen worden sind, war dies bei Gallussäure so nicht möglich. Innerhalb einer Messreihe waren die Werte homogen, jedoch waren einzelnen Messreihen untereinander nicht vergleichbar, da die Peakflächen deutlich unterschiedlich war. Deshalb wurde hier ein anderes Verfahren angewandt. Dabei wurde zwar weiterhin mit einer Durchflussmesszelle gemessen, jedoch wurde kontinuierlich jeweils für fünf Minuten eine Messlösung vermessen. Dabei ergab sich eine Messung wie in 3.3.6 dargestellt. Aus den Differenzen der Signalthöhen wurde dann eine Kalibriergerade abgeleitet.

Als Messlösungen wurden sowohl eine Pufferlösung als Blindwert sowie Gallussäure-Lösungen mit den Konzentrationen 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 1,000 mM, 1,500 mM, 2,000 mM, 2,500 mM, 3,000 mM, 3,500 mM, 4,000 mM, 4,500 mM und 5,000 mM verwendet. Die Messreihen wurden insgesamt viermal durchgeführt.

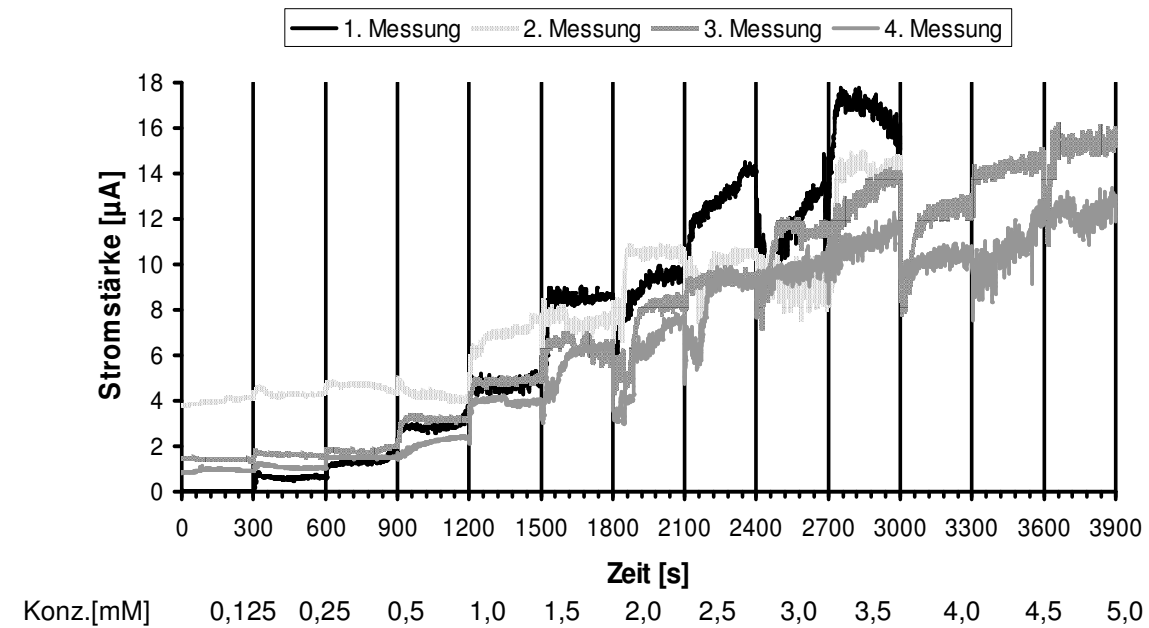


Abbildung 3.3.7 Bestimmung von Gallussäure
Puffer: Phosphat-Puffer III; Potential $E=670\text{ mV}$

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte aus den mittleren Peakhöhen. Dabei wurden die Differenzen zwischen den verschiedenen Messlösungen gebildet und die vier Messreihen zusammengefasst. Daraus ergibt sich eine Kalibriergerade nach 3.3.8. Aufgrund von nicht mehr aussagekräftigen Messwerten in dem Konzentrationsbereich von 2,000 mM bis 5,000 mM wurde dieser Bereich nicht mehr berücksichtigt. Im Bereich von 0,125 mM bis 1,5 mM lässt sich eine Kalibriergerade erstellen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9986.

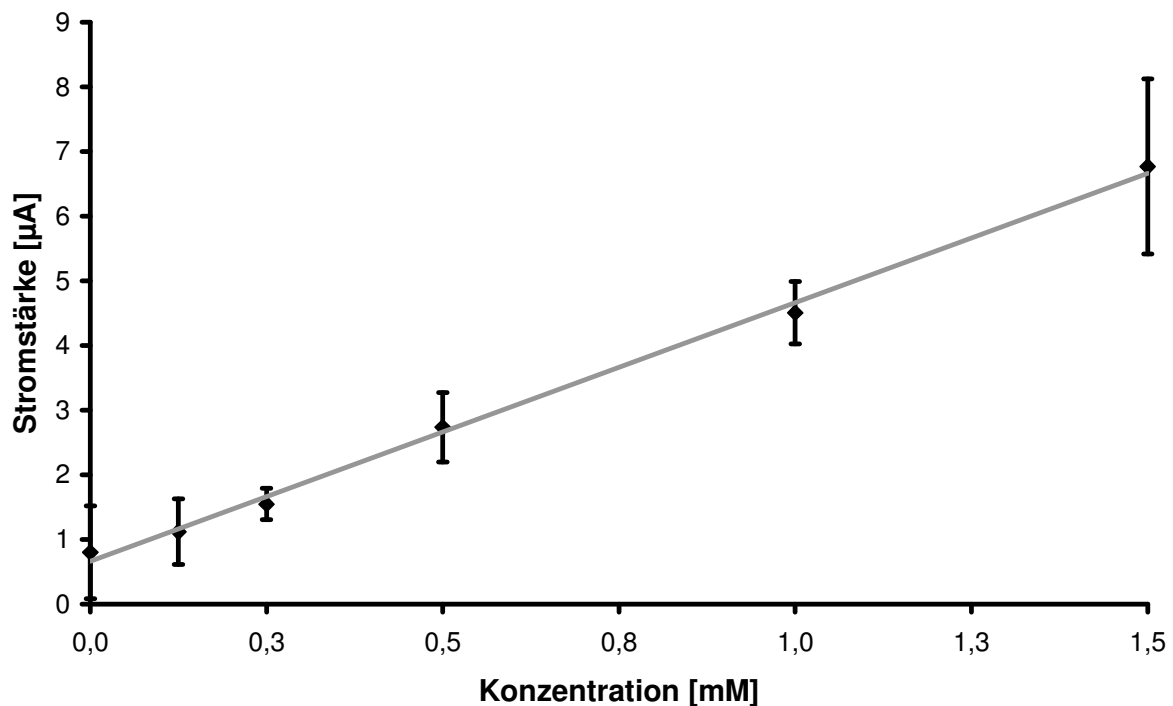


Abbildung 3.3.8 Bestimmung von Gallussäure über die Differenzen der Peakhöhen

Berechnet man aus den erhaltenen Werten die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, so erhält man eine Nachweisgrenze von 0,15 mM und eine Bestimmungsgrenze von 0,51 mM.

3.3.2.5 Amperometrischen Messungen von Realproben

Es soll getestet werden, ob Realproben mit dem Biosensor zuverlässig quantitativ gemessen werden können. Um den Gehalt in den untersuchten Realproben zu bestimmen, damit man dann diese mit den ermittelten Werten des Biosensors vergleichen kann, wird eine nasschemische Methode verwendet. Hierbei handelt es sich um die Folin-Ciocalteu-Methode (Referenzmethode für Polyphenole). Da sowohl die Biosensor- wie auch die Referenzmethode alle Polyphenole erfassen, muss eine Bezugssubstanz bestimmt werden, auf der die Ergebnisse normiert werden. In diesem Fall wird (-)-Epicatechin als Bezugssubstanz verwendet. Die Ergebnisse werden somit in „mg Epicatechin/L“ als Epicatechin-Äquivalente angegeben.

3.3.2.5.1 Bestimmung der Realproben per Referenzmethode

Wie erwartet liefert die Referenzmethode nach Folin-Ciocalteu eine gute Korrelation (0,9994) der Kalibriergeraden (Abbildung 3.3.9). Der Messbereich umfasst eine Zehnerpotenz und liegt zwischen 0,4 mg Epicatechin/L und 4 mg Epicatechin/L.

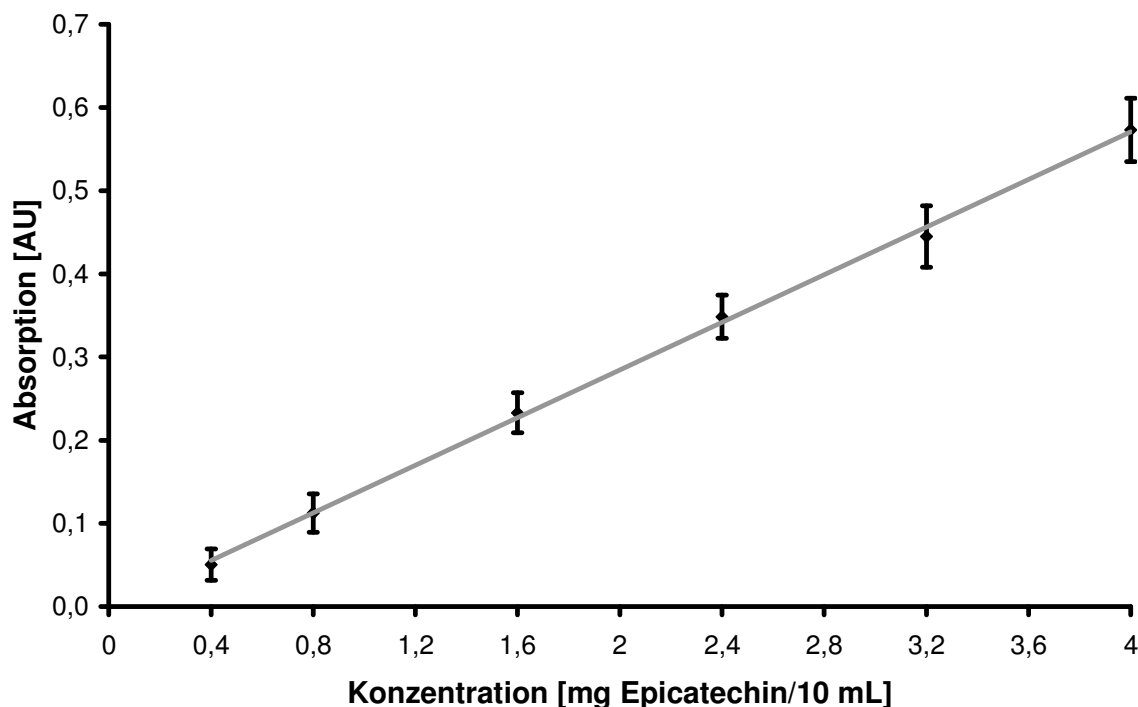


Abbildung 3.3.9 Photometrische Bestimmung von (-)-Epicatechin nach Folin-Ciocalteu
Konzentrationsbereich von 0,4 mg/10 ml bis 4 mg/10 ml; Doppelbestimmungen;

3. Ergebnisse

In Tabelle 20 sind die ermittelten Werte für Polyphenole in den verschiedenen Teesorten und Säften aufgeführt. Auffällig ist, dass die Standardabweichung der ermittelten Werte des Aroniasaftes um fast ein Faktor 10 größer sind als die Standardabweichungen der restlichen Realproben.

Tabelle 20 Berechnete Ergebnisse der Realproben; Doppelbestimmung

Probe	1. Messung [mg/l]	2. Messung [mg/l]	Konzentration Mittelwert [mg Epicatechin/l]	Standardabweichung
Chan Mee	705,800	744,235	725,02	27,18
Gun Powder	752,970	826,345	789,66	51,88
Pi Lo Chun	728,512	768,693	748,60	28,41
Aroniasaft	5730,26	5227,11	5478,69	355,78
Cranberry	1104,12	1171,21	1137,67	47,44

3.3.2.5.2 Bestimmung der Teeproben per Biosensor

Die Epicatechin-Kalibriergerade zeigt eine gute Korrelation. Es konnte im Bereich von 0,1 mg Epicatechin/10 ml bis 1 mg Epicatechin/10 ml gemessen werden. Die Nachweisgrenze wurde mit 0,077 mg Epicatechin/10 ml berechnet und die Bestimmungsgrenze mit 0,231 mg Epicatechin / 10 ml (Nachweisgrenze 25,0 mM; Bestimmungsgrenze 75,0 mM).

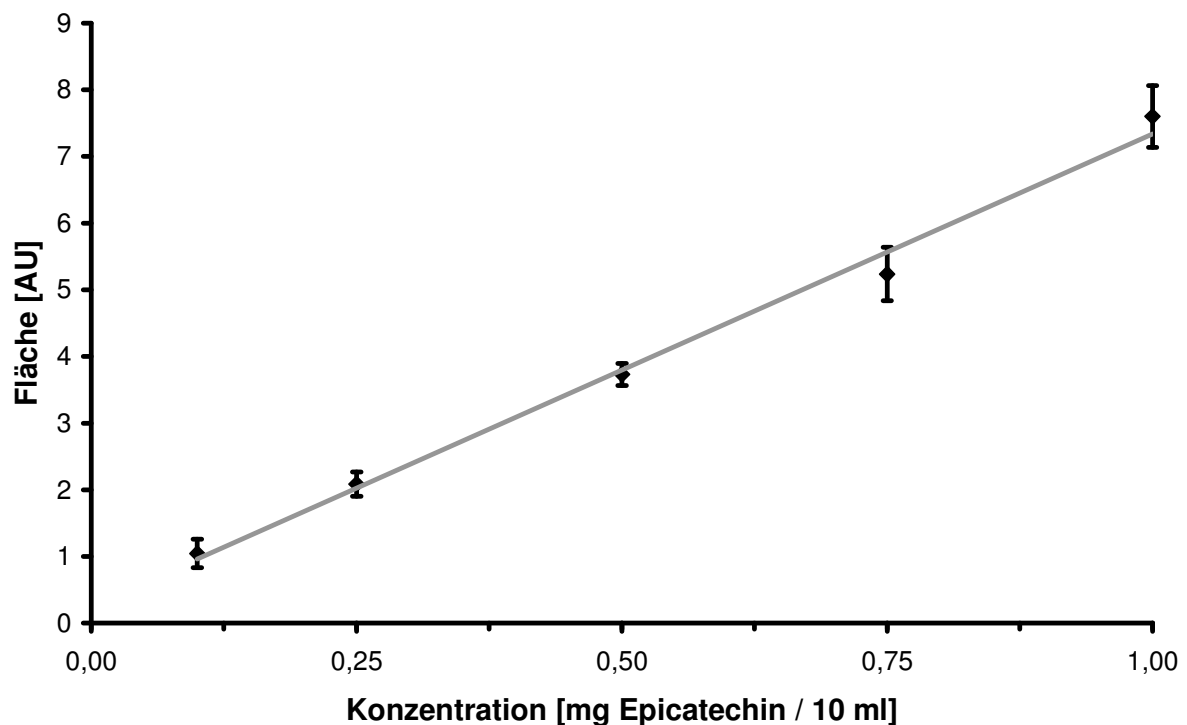


Abbildung 3.3.10 Kalibriergerade von (-)-Epicatechin in Phosphatpuffer III
Die Messung erfolgte bei einem Potential von $E=670$ mV mit einem AC1.W2.R1-BVT-Sensor (Beschichtung mit FNPA).

Daraus ließen sich folgende Werte für die drei Tee-Proben ermitteln:

Tabelle 21 Berechnete Ergebnisse der Dreifachbestimmung der Tee-Proben mittels Biosensor

	Konzentration [mg Epicatechin / l]		
Messung	Chan Mee	Gun Powder	Pi Lo Chun
1	1065,66	1130,63	1224,64
2	1194,53	1066,63	1123,56
3	706,05	831,91	779,72
Mittelwert	988,75	1009,72	1042,64
Standardabweichung	253,16	157,28	233,23

3.3.2.5.3 Vergleich der ermittelten Werte für Tee

Vergleicht man die ermittelten Werte der Referenzmethode und der Biosensormethode so sind zwei Dinge auffällig (siehe Abbildung 3.3.11). Zum einen sind die ermittelten Werte der Biosensormethode im Schnitt um ca. 260 mg Epicatechin/l höher als die ermittelten Referenzwerte. Zum anderen sind die Standardabweichungen der Biosensormethode bis zum Faktor 10 größer als die Standardabweichungen der Referenzmethode. Dies deutet auf eine größere Robustheit der Referenzmethode hin. In Anbetracht der Selektivität des Biosensors muss aber davon ausgegangen werden, dass die Referenzmethode nicht alle Polyphenole erfasst oder aber nicht alle Polyphenole mit dem Farbreagenz umgesetzt werden.

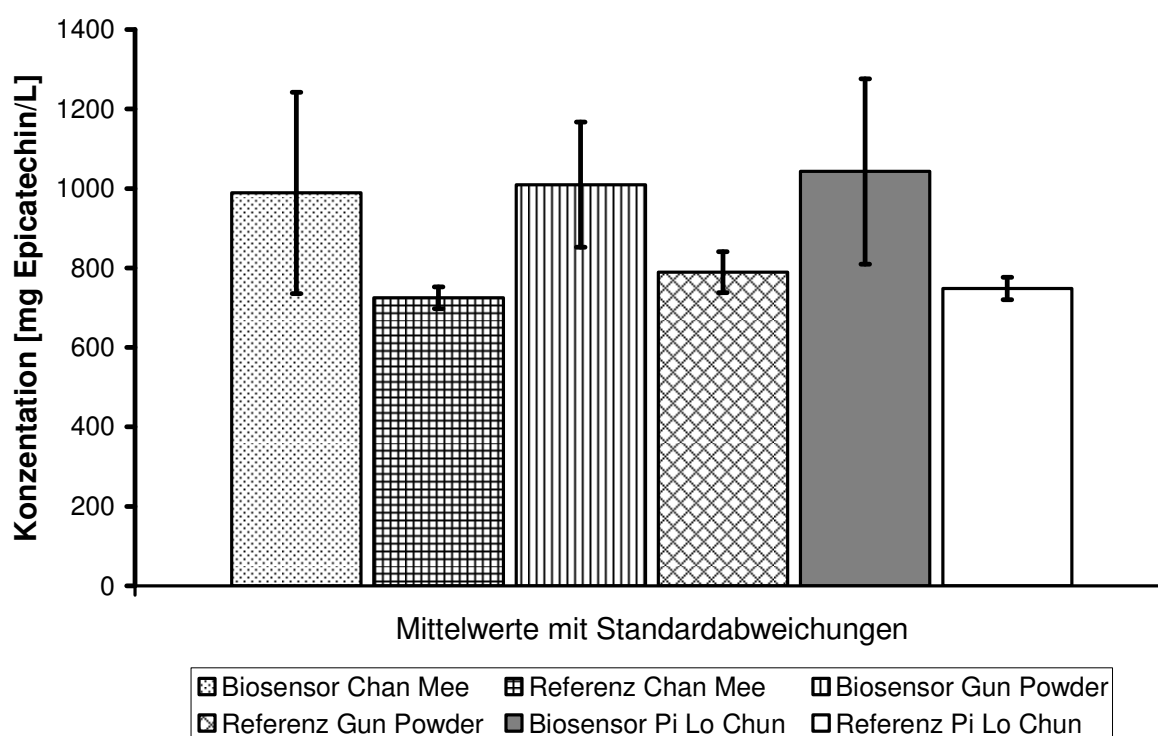


Abbildung 3.3.11 Vergleich der Ergebnisse des Biosensors und der Referenzmethode

3.3.2.5.4 Bestimmung der Saftproben per Biosensor

Die Epicatechin-Kalibriergerade zeigt eine gute Korrelation (siehe Abbildung 3.3.12). Es konnte im Bereich von 0,4 mg Epicatechin/10 mL bis 2,4 mg Epicatechin/10 mL gemessen werden. Die Nachweisgrenze wurde mit 0,208 mg Epicatechin/10 mL berechnet und die Bestimmungsgrenze mit 0,416 mg Epicatechin/10 mL. Umgerechnet in molare Konzentrationen (Molmasse Epicatechin $u=290$ g/Mol) ergibt dies eine Nachweisgrenze von 71,7 mM und eine Bestimmungsgrenze von 143,4 mM. Diese Werte unterscheiden sich von den ermittelten Werten der Kalibriergerade für die Tee-Versuche. Dies resultiert aus den verschiedenen Konzentrationen, die für die Kalibriergeraden eingesetzt worden sind. Aufgrund der statistischen Auswertung zur Bestimmung von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze haben die verwendeten Konzentrationen einen direkten Einfluss auf Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

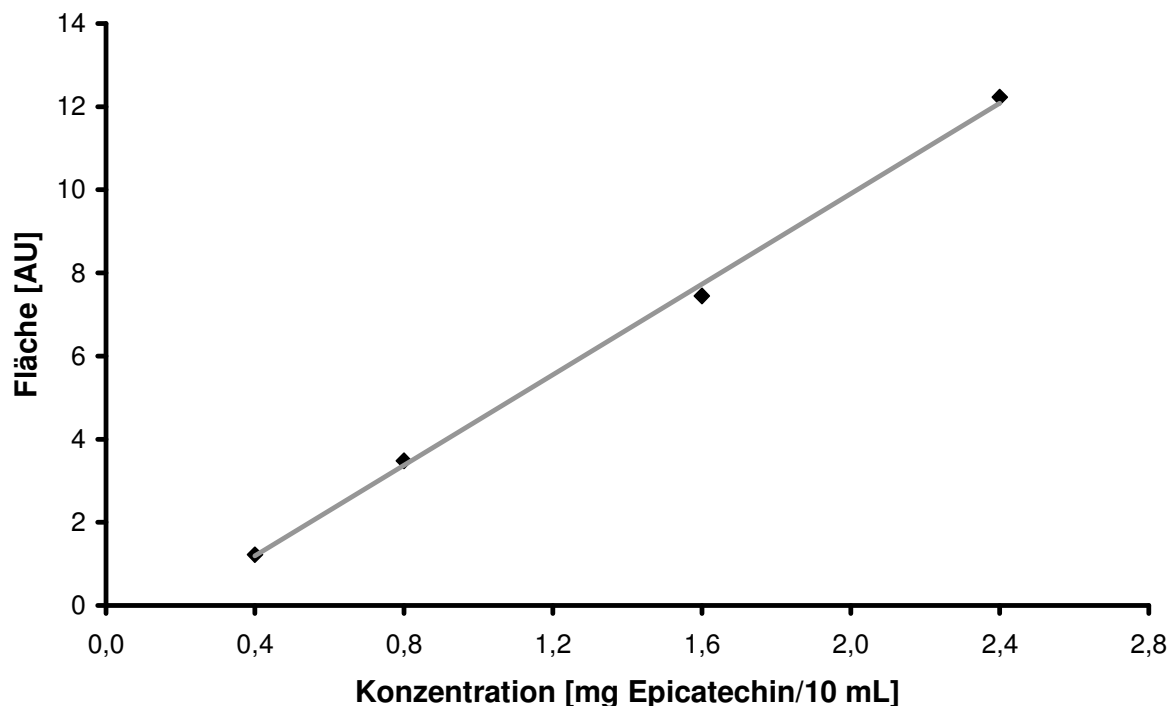


Abbildung 3.3.12 Kalibriergerade von (-)-Epicatechin in Phosphatpuffer III
Die Messung erfolgte bei einem Potential von $E=670$ mV mit einem AC1.W2.R1-BVT-Sensor

In Tabelle 22 sind die ermittelten Werte für die Saft-Proben, die mit Hilfe der Kalibriergeraden errechnet worden sind, aufgeführt.

Tabelle 22 Berechnete Ergebnisse der Doppelbestimmung der Saft-Proben mittels Biosensor

	Konzentration [mg Epicatechin/L]	
Messung	Aroniasaft	Cranberrysaft
1	3181,18	1357,87
2	3321,18	1280,78
Mittelwert	3251,18	1319,33
Standardabweichung	99,00	54,52

3.3.2.5.5 Vergleich der ermittelten Werte für die Saftproben

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tee-Proben (ähnliche Werte für alle Teesorten jeweils für die Biosensor- und Referenzmethode) unterscheiden sich die Ergebnisse für die Messungen des Aronia-Saftes deutlich von den Ergebnissen der Messungen des Cranberry-Saftes (Abbildung 3.3.14). Während für den Cranberry-Saft Werte in der gleichen Größenordnung ermittelt werden konnte, weicht das Ergebnis der Biosensor-Messung des Aronia-Saftes deutlich von dem Ergebnis der Referenz-Messung ab (~ Faktor 1,5). Eine Sättigung des Biosensors kann ausgeschlossen werden, da sich der ermittelte Polyphenol-Gehalt innerhalb der Kalibriergeraden befunden hat, also im linearen Messbereich des Sensors. Nichtsdestotrotz ist die Anwendung als Screening-Methode erfolgreich verlaufen.

Ein weiterer Unterschied im Vergleich zu den Untersuchungen mit den Tee-Proben ist in beiden Fällen die Standardabweichung der Biosensor-Messungen, die geringer ist als die Standardabweichung der Referenzmethode. Während jedoch die Standardabweichung bei den Messungen für den Cranberry-Saft nur einen kleinen Unterschied aufweist, ist die Standardabweichung der Referenzmethode für den Aronia-Saft deutlich größer (~ Faktor 3,5) als die Standardabweichung der Biosensormethode. Eine größere Robustheit der Referenzmethode scheint bei den Säften im Gegensatz zu den Tee-Proben damit nicht gegeben zu sein.

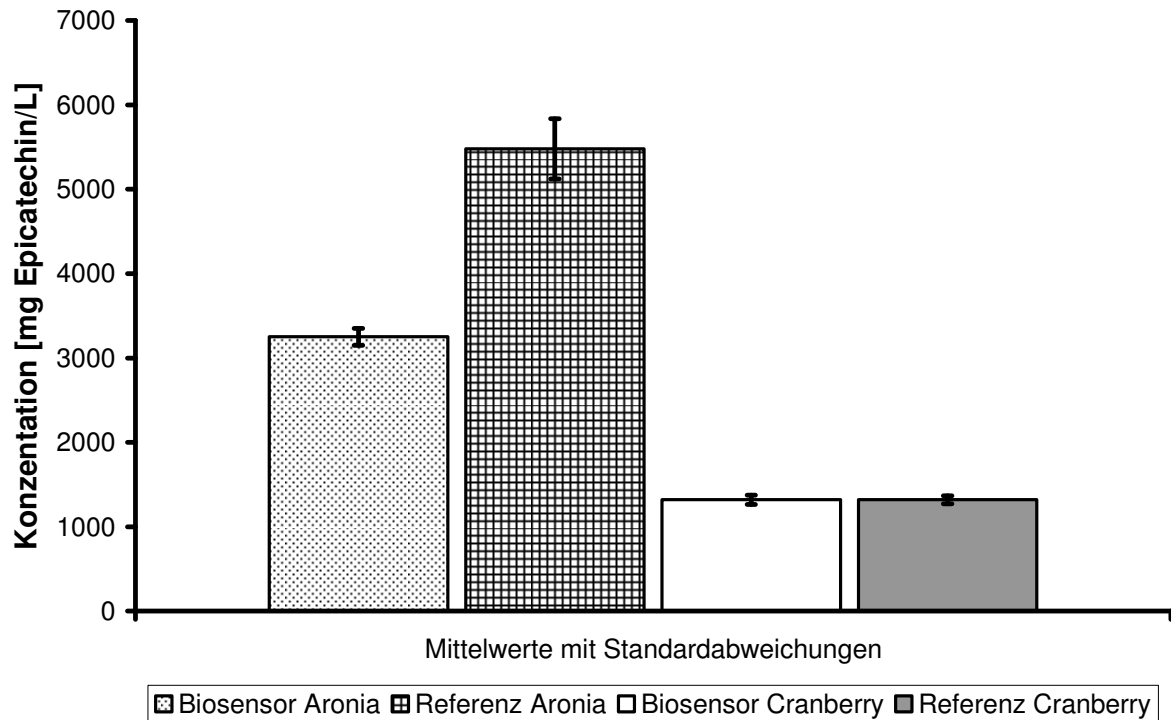


Abbildung 3.3.13 Vergleich der Ergebnisse des Biosensors und der Referenzmethode

3.3.2.6 Lagerstabilität

Zur Bestimmung der Lagerstabilität der einzelnen Dickschichtsensoren wurde ein ABTS-Test durchgeführt (für die Methode siehe Kapitel 2.3.13). Der Versuch wurde mit fünf TFT-Sensoren durchgeführt, auf deren Platin-Arbeits Elektrode eine mit FNPA immobilisierte Laccase-Beschichtung aufgebracht worden ist. Zur Absicherung der Messwerte wurde ein Reagenzienblindwert mitgeführt.

Wie aus Abbildung 3.3.14 zu erkennen ist, steigt im Mittel die Absorption der vermessenen Lösungen und damit die Aktivität der mit Laccase beschichteten Platinelektrode im Untersuchungszeitraum von vier Wochen. Für die Messtage 25.10.07 und 05.11.07 kann man deutliche Ausreißer nach oben für einzelne Sensoren feststellen. Am 12.11.07 kann man erkennen, dass die Elektrode AC1.W2.R1-1 im Vergleich zu den anderen Elektroden eine deutlich niedrigere Aktivität hat.

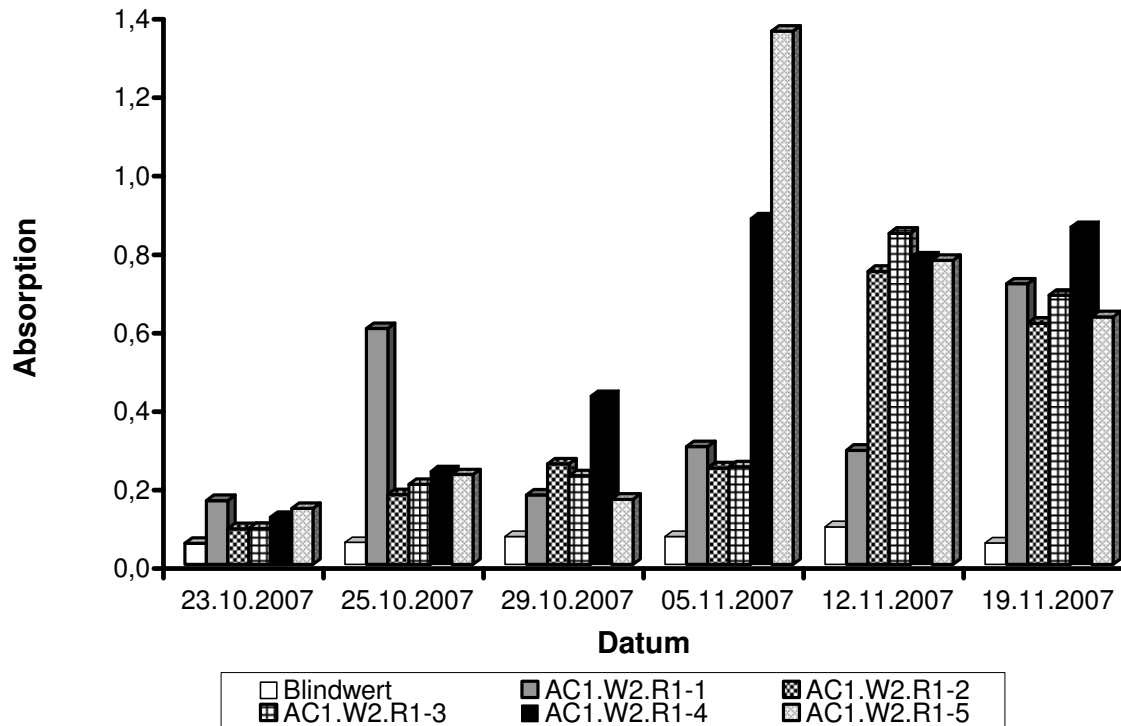


Abbildung 3.3.14 Messung der Lagerstabilität über einen Zeitraum von 28 Tagen
Die Lagerung der Sensoren erfolgte bei +4°C in Phosphatpuffer IV.

3.4 REM-Aufnahmen

Um die Elektrodenoberfläche der mit PLA-beschichteten Makroelektroden optisch bewerten zu können, wurden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen durchgeführt. Dazu wurde sowohl eine Elektrode mit neuer Beschichtung, sowie zwei Elektrodenbeschichtungen, die zuvor für Messungen verwendet worden sind, rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

3.4.1 REM-Aufnahmen einer ungenutzten PLA-beschichteten Elektrode

In Abbildung 3.4.1 sind REM-Aufnahmen einer ungenutzten mit einem PLA/Enzym-Gemisch beschichteten Elektrode dargestellt. Auf Bild A der Abbildung 3.4.1 ist ein kleiner Ausschnitt aus der Oberfläche dargestellt. Neben den vorhandenen Poren erkennt man deutlich größere Öffnungen, die durch das Entweichen des Dichlormethans und die damit einhergehende Blasenbildung entstehen. Dies wird auch in Bild B der Abbildung 3.4.1 nochmals deutlicher dargestellt. Man erkennt am Rand die Aufwölbungen, die durch das Platzen einer Blase entstanden sind. Im Bereich dieser geplatzten Blase sind keine weiteren Poren erkennbar.

Bild C der Abbildung 3.4.1 zeigt zwar auch eine Wölbung bzw. eine Kraterbildung, jedoch ist im Gegensatz zu Bild B der Abbildung 3.4.1 deutlich die Porung über die ganze Fläche der Wölbung zu erkennen.

Aufgrund des Inneren des Kraters ist davon auszugehen, dass es sich hier um eingeschlossenes Material handelt z.B. Aktivkohlepartikel.

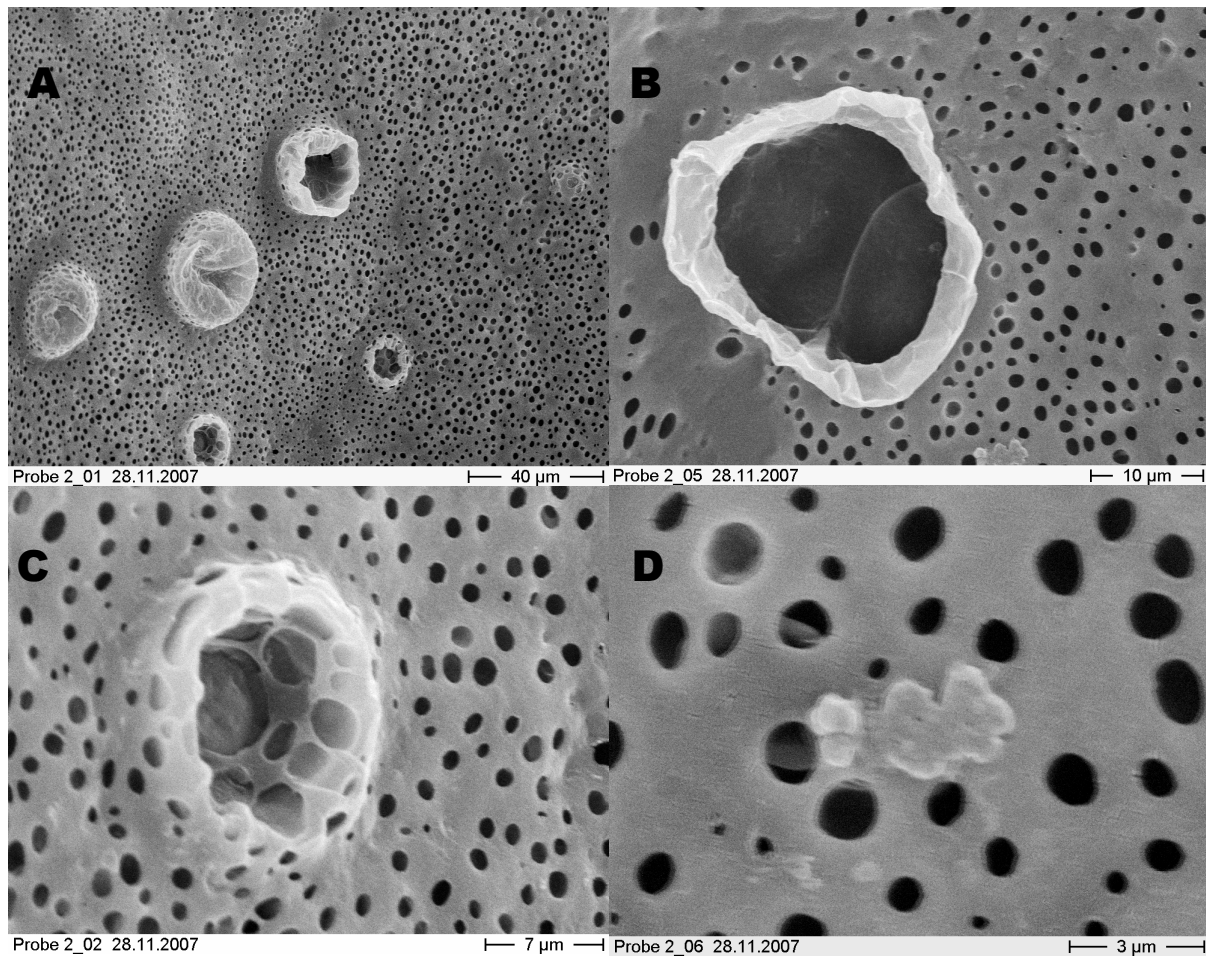


Abbildung 3.4.1 REM-Aufnahmen einer unbenutzten mit PLA /Enzym-Gemisch beschichteten Elektrode
Von links oben nach rechts unten jeweils Vergrößerung der Aufnahmen.

In Bild D der Abbildung 3.4.1 erkennt man in der Mitte des Bildes ein wolkenartiges Gebilde, welches auf der Oberfläche liegt. Dabei handelt es sich entweder um ein Partikel, der während der Trocknung auf die Oberfläche gelangt ist oder um einen Partikel, der aus der Enzymlösung auf die Oberfläche gelangte. Links neben dem Gebilde erkennt man durch die Poren die Struktur unterhalb der Oberfläche. Auch hier scheinen sich weitere Poren zu befinden, so dass man daraus ableiten kann, dass die poröse Struktur auch innerhalb der Beschichtung vorhanden ist. Neben den vor allem durch die Blasenbildung bei Trocknung bedingten Kratern, erkennt man aber eine in sich homogene Struktur, die verhältnismäßig glatt ist.

3.4.2 REM-Aufnahmen benutzter PLA-beschichteter Elektroden

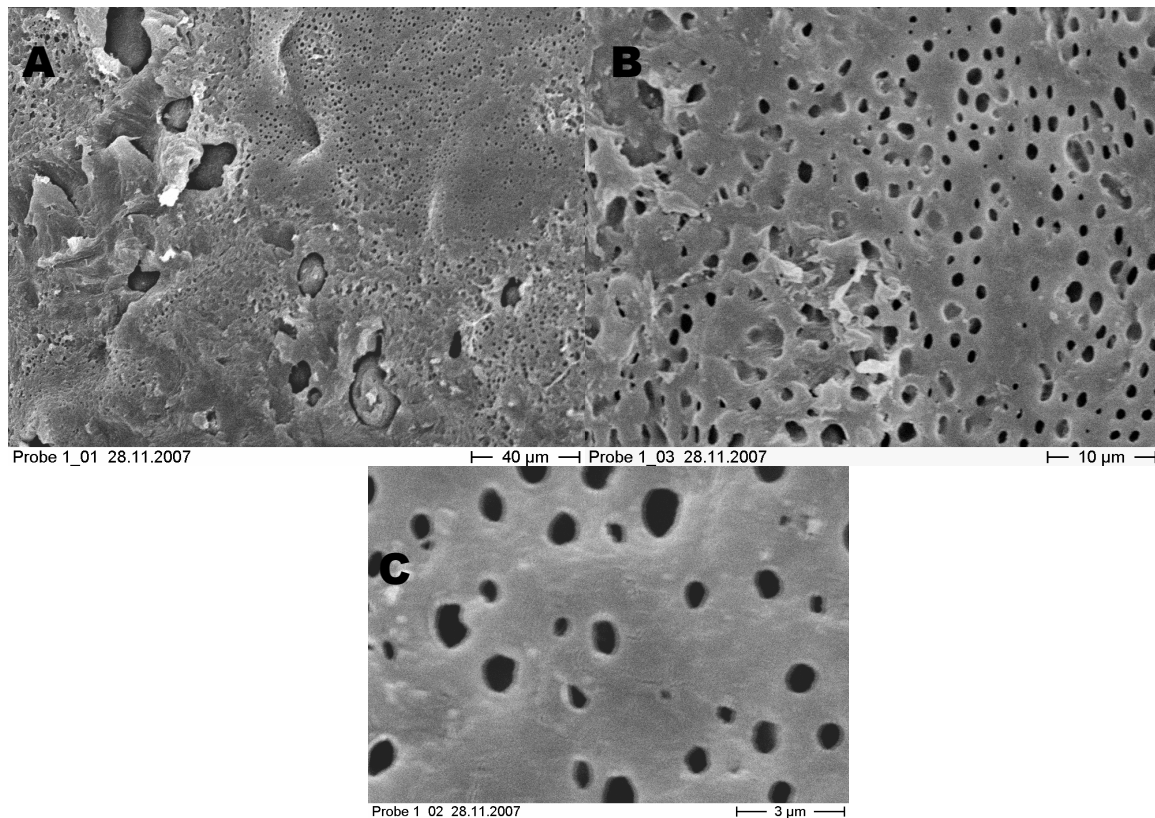


Abbildung 3.4.2 Darstellung einer mit PLA/beschichteten Elektrode
Mit dieser Elektrode wurde 9 Tage zuvor 28 Messungen durchgeführt

In Abbildung 3.4.2 und Abbildung 3.4.3 sind zwei verschiedenen Elektroden dargestellt, die sich hinsichtlich ihres Alters und der Anzahl der Messungen unterscheiden. Die in Abbildung 3.4.2 dargestellte REM-Aufnahmen zeigen eine Elektrodenoberfläche, die neun Tage alt ist und insgesamt 28 Messungen durchgeführt worden sind. Man erkennt deutliche Unterschiede zwischen Bild A der Abbildung 3.4.2 und Bild A der Abbildung 3.4.1. Im Gegensatz zu der unbenutzten Elektrode ist auf Bild A der Abbildung 3.4.2 eine deutlich zerklüftete Struktur zu erkennen. Des Weiteren sind deutlich weniger Poren zu erkennen als auf der unbenutzten Elektrode. Bei genauerer Betrachtung der Oberfläche erkennt man, dass neben den groben Strukturen auch Mikrostrukturen auf der Oberfläche entstanden sind (Bild B der Abbildung 3.4.3). Auf Bild C der Abbildung 3.4.3 sind deutliche Ablagerungen auf der Oberfläche zu sehen.

Bei der in Abbildung 3.4.3 dargestellten Elektrode handelt es sich um eine Elektrode, deren Beschichtung 50 Tage alt ist und mit der insgesamt 247 Messungen durchgeführt worden sind. Schon in Bild A der Abbildung 3.4.3 erkennt man den Unterschied zu den vorherigen Elektroden. Die Struktur der Elektrode ist nochmals zerklüfteter gegenüber der vorherigen

Elektrode. Man kann auf dieser Aufnahme nur noch vereinzelt Poren erkennen. Schaut man sich die nächste Vergrößerungsstufe an (Abb. 3.4.3 Bild B + Bild C), so sind auch hier nur noch wenige Poren zu erkennen. Auf diesen Aufnahmen scheint es so, als ob sich auf der Oberfläche der Elektrode Partikel angelagert haben (Abb. 3.4.3 Bild C, Mitte und Abb. 3.4.3 Bild B, oberer, rechter Rand, längliches Gebilde). Wenn man sich die Aufnahmen D und E der Abbildung 3.4.3 anschaut, so erkennt man deutlicher, dass die Elektrodenoberfläche mit einem Belag überzogen ist. Auch auf diesen Aufnahmen ist im Vergleich zu den anderen beiden Elektroden die deutlich geringere Anzahl an Poren zu erkennen. In Abbildung 3.4.3-F ist nochmals eine Pore näher betrachtet worden. Man erkennt innerhalb der Öffnung weitere Poren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die poröse Struktur, wenn auch erheblich schwächer als bei den beiden übrigen Elektroden, noch vorhanden ist. Die auf der Oberfläche zu sehenden Risse, sind Risse der Goldbeschichtung, die für die REM-Aufnahmen aufgebracht werden muss, und gehören nicht zu der eigentlichen Elektrodenoberfläche.

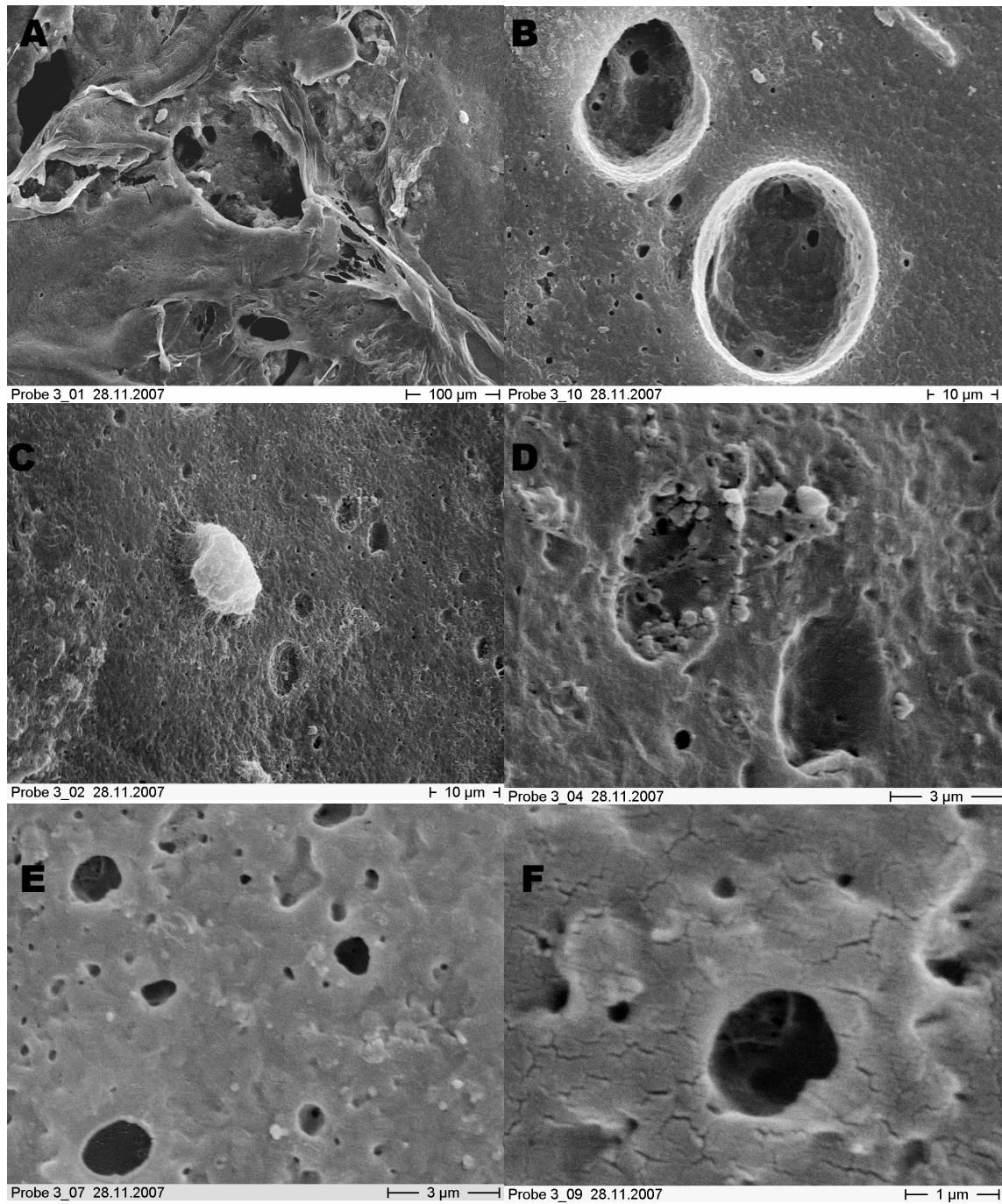


Abbildung 3.4.3 REM-Aufnahmen einer mit PLA/beschichteten Elektrode;
Diese Elektrode ist 50 Tage alt und es wurden mit ihr 247 Messungen durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Verwendung von PLA als Immobilisierungsreagenz

PLA hat als Immobilisierungsreagenz einige Vorteile gegenüber den klassischen Immobilisierungsverfahren. Als „grüner Kunststoff“ ist PLA zum einen nicht vom Erdöl abhängig und kann unbegrenzt jederzeit produziert werden. Des Weiteren wird PLA biologisch vollständig abgebaut. Diese Punkte sind aus Zukunfts- und Umweltsicht nicht außer acht zu lassen. Darüber hinaus bietet PLA aufgrund seiner Porosität eine gute Möglichkeit Enzyme mittels Matrixeinhüllung auf eine Elektrode zu binden. Dieses schonende Verfahren ermöglicht eine hohe Enzymaktivität auf der Elektrode.

4.1.1 Möglichkeiten zur Verflüssigung von PLA

Da es, wie bei Kunststoffen üblich, nicht eine Form des PLAs gibt, sondern durch die Herstellungsweisen verschiedene Konformationen des PLAs möglich sind, die sich z.B. in der Kettenlänge und deren Verzweigung unterscheiden und damit sich auch in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden, musste zuerst untersucht werden, welches Polymer sich für die Anwendung als Immobilisierungsreagenz am Besten eignet. Untersucht wurden Polymere der Firma Boehringer-Ingelheim und Biomer. Das Polymer muss zwei entscheidende Eigenschaften haben, um als Matrix eingesetzt werden zu können. Zum einen muss es gut in den flüssigen Aggregatzustand überführt werden können. Zum anderen muss es aber auch schnell und unkompliziert auf der Elektrode wieder in die feste Form zurück überführt werden können.

Um das PLA in einen flüssigen Zustand überführen zu können, gibt es zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit besteht darin, dass Polymer zu schmelzen. Dabei sind Temperaturen von über 100°C nötig. Weiterhin besteht die Möglichkeit, das PLA in einem organischen Lösungsmittel zu lösen. Das Schmelzen des Polymers als mögliche Methode wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da dies praktisch nicht umsetzbar ist. Um eine geringe Viskosität des PLAs zu erhalten, sind deutlich höhere Temperaturen als 100°C nötig (mind. 170°C), die über einen längeren Zeitraum eingehalten werden müssen. Dies würde einen komplizierten Versuchsaufbau erfordern. Es können zwar ausgewählte Laccasen Temperaturen bis 80°C vertragen (Laccasen aus *Tricholoma giganteum*, *Bacillus licheniformis*) [BRENDA Enzyme Database, 2009], aber in dem Bereich, indem das PLA flüssig ist, gibt es keine Laccase, die nicht degenerieren. Die zweite Möglichkeit, um das PLA in eine flüssige Form zu überführen, besteht darin, das PLA mit einem organischen Lösungsmittel zu lösen. Studien

zeigen, dass das Enzym Laccase durch organische Lösungsmittel zwar an Aktivität verliert, jedoch nicht vollständig inaktiviert wird [Ruiz, 2000].

Aus diesen beiden Möglichkeiten ergeben sich ebenfalls zwei Möglichkeiten um das Enzym auf der Elektrode erhärten zu lassen. Erhitzt man das Polymer, so muss es nur auf der Elektrode abkühlen, um wieder in den festen Zustand überführt zu werden. Das Polymer kühlt bei Raumtemperatur aufgrund der geringen Menge sehr schnell wieder ab. Dabei bildet das PLA Tropfen, die aufgrund ihrer glatten Oberfläche fast farblos erscheinen.

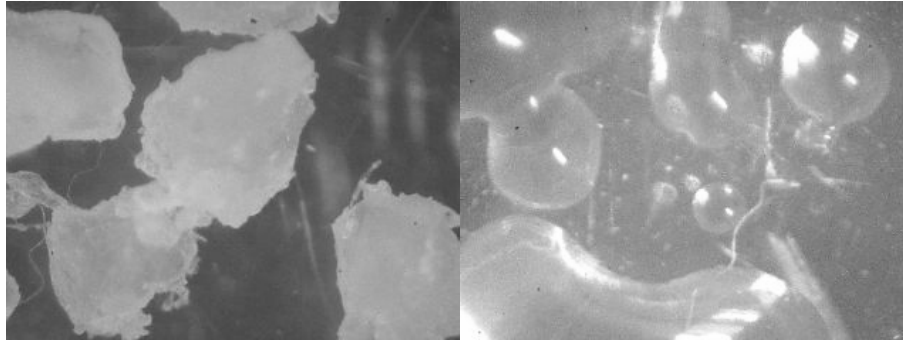


Abbildung 4.1.1 Polylactid vor dem Schmelzen (links) und nach dem Erstarren (rechts) (Vergrößerung 1:200) Deutlich zu erkennen ist die Tropfenform des erstarrten PLAs im Gegensatz zum Granulat (links). Aufgrund der Oberfläche des erstarrten PLAs ist das Polymer nun fast farblos

Während beim Schmelzen des PLAs einzig und alleine die Temperatur der entscheidende Faktor ist, sind bei der Verwendung eines Lösungsmittels mehrere Faktoren zu beachten. Ein Faktor ist die Wahl des Lösungsmittels selbst, sowie die Menge des Lösungsmittels, die zugegeben wird. Des Weiteren ist auch hier die Temperatur ein bestimmender Faktor. Außerdem muss es eine Möglichkeit geben, dass Polymer wieder in einen festen Zustand zu überführen.

4.1.1.1 Unterschiede in der Löslichkeit verschiedener PLAs

Es wurden PLAs von Boehringer Ingelheim (Resomer[®] Typ: L206S, R202S und R203S) und von Biomer (PLLA) untersucht. Dabei wurde die Löslichkeit der PLAs in den organischen Lösungsmitteln 1,4-Dioxan, Aceton, Dichlormethan, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylacetat und N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) überprüft. Während es sich bei den PLAs vom Typ „R202S“ und „R203S“ um D,L-Lactide handelt, sind die PLAs vom Typ „L206S“ und „PLLA“ L-Lactide. Dies hat unterschiedliche physikalische Eigenschaften zur Folge, die sich auch in der jeweiligen Löslichkeit der PLAs widerspiegelt (siehe auch Tabelle 14, Kapitel 3.1.3.1). Während die D,L-Lactide in allen Lösungsmitteln sehr gut löslich waren, waren die L-Lactide nur bedingt löslich. Das PLA „L206S“ war nur in Dichlormethan löslich, das „PLLA“ war sehr gut in Dichlormethan und gut in NMP löslich. Ein Vergleich zwischen dem

Biomer PLLA und den Resomer[®]-PLAs ist schwierig, da für das Biomer PLLA in der Literatur nur ein Molekulargewicht (200.000 kDa) angegeben ist, für die Resomer[®] PLAs jedoch die inhärente Viskosität, so ist der Vergleich innerhalb der Resomer[®] PLAs möglich.

Tabelle 23 Vergleich der inhärenten Viskosität der verschiedenen Resomer PLAs. Die Messung der inhärenten Viskosität erfolgte mittels Viskosimeter bei 25°C; Es wurde eine 0,1 %-ige Lösung in Chloroform vermessen

	Resomer [®] L206S	Resomer [®] R202S	Resomer [®] R203S
Inhärente Viskosität	0,8-1,2 dl/g	0,16-0,24 dl/g	0,25-0,35 dl/g

Vergleicht man die inhärente Viskosität des PLLAs L206S mit den D,L-Lactiden (R202S und R203S), so fällt auf, dass die Werte für die D,L-Lactide deutlich kleiner sind. Dies bedeutet, dass die D,L-Lactide ein kleineres Molekulargewicht haben als das L,L-Lactid (L206S). Damit lässt sich die gute Löslichkeit der D,L-Lactide gegenüber dem L,L-Lactid in organischen Lösungsmitteln erklären. Durch das kleinere Molekulargewicht der einzelnen Polymerstränge der D,L-Lactide können die Lösungsmittel zwischenmolekulare Verbindungen leichter trennen. Aufgrund der Löslichkeit des Biomer PLLAs im Vergleich zu den Resomer[®] PLAs lässt sich sagen, dass das Biomer PLLA ein ähnliches, etwas geringeres Molekulargewicht haben muss als das Resomer[®] PLA L206S.

Da das PLA „L206S“ sich in Dichlormethan nur langsam auflöste, wurde dieses PLA nicht weiter berücksichtigt. Mit den anderen drei Polymeren (R202S, R203S und Biomer PLLA) wurden weitere Versuche zur Adhäsion des Polymers auf der Elektrodenoberfläche durchgeführt. (siehe 3.1.3.2).

4.1.2 Die Adhäsion von PLA an Glassy Carbon Elektroden

4.1.2.1 Unterschiedliche Adhäsionstheorien

Es existiert eine große Anzahl von Modellen zur Adhäsion, die Adhäsionstheorien genannt werden. Dabei werden zwei Theorien in der Literatur häufig erwähnt [Nikolova, 2005]. Zum einen das mechanische Modell und zum anderen das spezifische Modell. Als Grundlage des mechanischen Adhäsionsmodells dient der Druckknopfeffekt. Dabei dringt die Substanz in Unebenheiten des Substrats ein und bildet formschlüssige Verbindungen. Dies gelingt nur, wenn die Substanz entweder flüssig ist oder mit großem Druck auf das Substrat gepresst wird. Dieses Modell funktioniert jedoch nicht bei glatten Oberflächen. Deshalb bedient man sich hier einem spezifischen Adhäsionsmodell, in dem die molekularphysikalischen, thermodynamischen und chemischen Vorgänge erfasst werden. Dabei wird das spezifische Adhäsionsmodell in die Polarisierungstheorie, die elektrostatische Theorie, die

thermodynamischen Theorie und die chemischen Adhäsionstheorie unterteilt. Die Polarisierungstheorie beruht auf der Annahme, dass beide Kontaktpartner über polare Atomgruppen verfügen, was wiederum zu Dipolwechselwirkungen führt [De Bruyne, 1935]. Bei der elektrostatischen Theorie wird postuliert, dass durch die Differenz des thermodynamischen Potentials zwischen Substanz und Substrat eine Ladungsträgerdiffusion an der Grenzschicht stattfindet. Die daraus resultierende elektrische Doppelschicht wird für die Adhäsion verantwortlich gemacht [Derjagin, 1950]. Bei der thermodynamischen Theorie wird die Adhäsion als Benetzungsvorgang betrachtet. Dabei ist die wichtigste Kenngröße dieser Theorie die Oberflächenenergie [Zismann, Fowkes, Good, 1963]. Diese wird als benötigte Arbeit zur Vergrößerung der Oberfläche um eine Flächeneinheit definiert.

Bringt man eine feste Oberfläche in Kontakt mit anderen Stoffen, seien sie gasförmig, flüssig oder fest, dann nimmt die Energie der Atome an der Phasengrenze durch Absättigung ihrer freien Valenzen ab. Bei Kenntnis der jeweiligen Oberflächenenergie lassen sich quantitative Rückschlüsse auf die Adhäsionsenergie ziehen [Nikolova, 2005]. Die chemische Adhäsionstheorie basiert auf der Annahme, dass es an der Grenzfläche zwischen Substanz und Substrat zu kovalenten Bindungen kommt [Nikolova, 2005].

4.1.2.2 Glassy Carbon und seine Oberfläche

Glassy Carbon hat eine stark fehlgeordnete Graphit-Struktur. Die Kohlenstoffatome sind sp^2 -hybridisiert und weisen eine hexagonale Struktur auf. In der Arbeit von H.J.F. Harris wird beschrieben, dass Glassy Carbon eine fullerenartige Mikrostruktur aufweist [Harris, 2004]. Obwohl die Oberfläche von Glassy Carbon glatt erscheint, weist unpoliertes Glassy Carbon „Krater“ mit mehreren Mikrometern Tiefe auf [Kuhnke, 2004]. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten und um die Glassy Carbon Oberfläche von Fremdkörpern zu befreien, wurde die Oberfläche der Elektroden mit Aluminiumoxid poliert.

4.1.2.3 Adhäsive Eigenschaften von PLA

Zu den adhäsiven Eigenschaften gibt es nur wenige Literaturstellen. Die vorhandenen Literaturstellen führen PLA mit schwacher bis starker Adhäsion auf [Natureworks, 2010]. Da eine streng empirische Ermittlung der Adhäsion nicht möglich war, wurden die verwendeten Polylactide auf die verwendeten Elektrodenoberflächen aufgegeben und visuell und mechanisch auf deren Bindungsverhalten überprüft. Bei den untersuchten Polylactiden Resomer L202S[®], Resomer L203S[®] und Biomer PLLA wurde unterschiedliches Adhäsionsverhalten beobachtet (siehe 3.1.3.2). Beim Vergleich der Polylactide erwies sich

das Produkt „Biomer PLLA“ als das Polylactid mit der besten Adhäsion gegenüber der Glassy Carbon-Elektroden.

4.1.2.4 Erläuterung der unterschiedlichen Adhäsion der verschiedenen PLAs

Um das unterschiedliche Haftungsvermögen der verschiedenen PLAs zu erläutern, muss zuerst die Stereochemie der Polylactide betrachtet werden. Dies ist vor allem für die Polarisierungstheorie wie auch für die chemische Adhäsionstheorie von Bedeutung. Während im Biomer PLLA nur L-Milchsäure zur Herstellung des Polylactids verwendet worden ist, bestehen die Resomer[®] Polylactide aus den beiden Enantiomeren L-Milchsäure und R-Milchsäure. Während Enantiomere sich in ihren physikalischen Eigenschaften nicht unterscheiden, abgesehen von der Drehrichtung polarisierten Lichtes, haben Polymere aus verschiedenen Enantiomere bzw. Mischungen aus Enantiomeren unterschiedliche physikalische Eigenschaften, falls keine Racemisierung eintritt [Kleine, 1959]. Einen weiteren Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften von PLA hat der verwendete Katalysator zur Herstellung des PLAs, zum Beispiel ZnO oder $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [Garlotta, 2001]. In Tabelle 24 sind unterschiedliche physikalische Eigenschaften dargestellt.

Tabelle 24 Effekte der Stereochemie und der Kristallstruktur des PLAs auf die mechanischen Eigenschaften

	L-PLA	Geglühtes L-PLA	D,L-PLA
Dehnbarkeit [MPa]	59	66	44
Reißdehnung [%]	7,0	4,0	5,4
Elastizitätsmodul [MPa]	3750	4150	3900
Streckfestigkeit [MPa]	70	70	53
Biegefestigkeit [MPa]	106	119	88
Ungekerbter Izod Aufprall [J/m]	195	350	150
Gekerbter Izod Aufprall [J/m]	26	66	18
Rockwell Härte	88	88	76
Formbeständigkeitstemperatur [°C]	55	61	50
Vicat Penetration [°C]	59	165	52

Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften verschiedener PLAs lässt sich auch die unterschiedliche Adhäsion erklären. Diese ergibt sich aus den stereochemisch unterschiedlich eingesetzten Milchsäuren, aus denen L-PLA, D-PLA oder D, L-PLA hergestellt wird. Wie schon in 4.1.2.3 erwähnt, erwies sich das L-PLA oder auch PLLA aufgrund empirischer Ermittlungen als PLA mit der besten Adhäsion gegenüber der Glassy

Carbon Elektrode. Aufgrund der besten Adhäsionseigenschaften des PLLAs auf den GC-Elektroden ist dies das PLA, mit dem weitere Versuch durchgeführt worden sind.

4.1.3 Herstellung eines elektrisch leitfähigen PLA-Polymers

Da PLA im Gegensatz zu leitenden Polymeren wie *trans*-Polyacetylen (PA), Poly(*para*)phenylen (PPP) oder Polyanilin (PANI), die aufgrund ihrer delokalisierten π -Elektronensysteme elektrisch leitend sind, elektrischen Strom nicht leitet, musste eine geeignete Substanz gefunden werden, die in Kombination mit PLA ein „leitendes Polymer“ erzeugt. Dabei darf der Stoff die physikalischen Eigenschaften des PLAs nur wenig beziehungsweise gar nicht verändern. In dieser Arbeit wurden die Substanzen Kupfer (als Pulver) und Aktivkohle getestet. Diese beiden Substanzen wurden aufgrund folgender Überlegungen gewählt. Zum einen musste berücksichtigt werden, dass die Substanzen als elektrischer Leiter eingesetzt werden können und in pulvriger Form erhältlich sind. Dies sind sowohl Aktivkohle wie auch die metallischen Elemente, die den Strom leiten, z.B. Kupfer, Eisen oder Silber. Weiterhin musste die inhibierende Wirkung der elektrisch leitenden Substanz auf das Enzym berücksichtigt werden. Da das Enzym in der Polymerpaste mit dem elektrisch leitenden Element in Kontakt kommt, könnte das Element einen Teil der Enzyme inhibieren und somit die Enzymaktivität auf der Elektrode herabsetzen.

4.1.3.1 Verwendung von Kupfer als elektrischer Leiter

Während Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) laut Literatur sowohl inhibierende (Laccase von *Trametes versicolor*) wie auch aktivierende (Laccase von *Rhus vernificera*) Eigenschaften auf Laccasen haben [BRENDA Enzyme Database, 2009], ist die Eigenschaft von elementarem Kupfer auf Laccasen in der Literatur nicht beschrieben. Da Kupfer sehr gute leitende Eigenschaften hat und im Vergleich zu anderen leitenden Elemente eine günstigste Kosten/Nutzen-Relation hat, wurden Leitfähigkeitstests mit Kupferpulver durchgeführt. Es wurde ein Kupfer-Pulver mit einer Korngröße von ca. 40 μm für die Untersuchungen verwendet. Im direkten Vergleich der kupferdotierten PLA-Beschichtung mit kohlenstoffdotierter PLA-Beschichtung fällt eine höhere Basislinie des Signals bei der Messung mit der kupferdotierten Beschichtung auf (siehe auch Abbildung 3.1.21).

4.1.3.2 Verwendung von Aktivkohle als elektrischer Leiter

Aktivkohle hat auf das Enzym Laccase keine inhibierenden Eigenschaften. Aufgrund dieser Eigenschaft und der guten Leitfähigkeit von Kohle wurde Aktivkohle als elektrisch leitendes Material im PLA getestet. Im Vergleich mit kupferdotiertem PLA ist die Basislinie bei mit aktivkohledotiertem PLA deutlich geringer. Aufgrund der geringeren Basislinie ist eine empfindlichere Messung möglich (ein „Autozero“ verschiebt nur den Rahmen der Messungen, die höhere Stromstärke der Basislinie bleibt bestehen). Des Weiteren stellt sich ein konstanter Drift bzw. ein Null-Drift schneller ein als bei PLA, welches mit Kupfer dotiert ist.

4.1.3.3 Erläuterung der unterschiedlichen Basislinien

Die Abhängigkeit von Stromstärke und Spannung wird durch das Ohmsche Gesetz beschrieben. Dabei ist die Stromstärke I proportional zur Spannung U geteilt durch den Widerstand R .

Formel 4: Ohmsche Gesetz

$$U = R * I$$

U = Spannung, R = Widerstand, I = Stromstärke

Bei einem homogenen ohmschen Material (also z.B. keine Halbleiterelemente) ist der Widerstand R proportional zur Länge l und umgekehrt proportional zum Querschnitt A des Leiters [Gerthsen, Vogel, 1993].

Formel 5

$$R = (\rho * l) / A$$

R = Widerstand, l = Länge des Leiters, A = Querschnitt des Leiters, ρ = spezifischer Widerstand

Aufgrund der gleichen Länge und des gleichen Querschnitts des elektrischen Leiters ist nur der spezifische Widerstand des Leiters relevant. Während Kohlenstoff einen spezifischen Widerstand von $3,5 \cdot 10^{-5} \Omega m$ hat, so hat Kupfer einen spezifischen Widerstand von $1,7 \cdot 10^{-8} \Omega m$ und damit einen um den Faktor 2000 kleineren spezifischen Widerstand als Kohlenstoff. Damit ergibt sich für Kupfer ein geringer Widerstand. Nach dem ohmschen Gesetz ist damit die Stromstärke bei gleichbleibender Spannung höher. Damit erklärt sich die höhere Basislinie bzw. die höhere Ausgangsstromstärke der kupferdotierten PLA-Beschichtung gegenüber der aktivkohledotierten PLA-Beschichtung.

4.1.3.4 Verwendung von Carbon Nanotubes (CNT) als elektrischer Leiter

Während Kohlenstoff einen spezifischen Widerstand von $3,5 \cdot 10^{-5} \Omega\text{m}$ hat, haben Carbon Nanotubes einen spezifischen Widerstand zwischen $5 \cdot 10^{-6} \Omega\text{m}$ bis hin zu $10^{-4} \Omega\text{m}$. Für die verschiedenen spezifischen Widerstände gibt es zwei Gründe. Zum einem muss zwischen den Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNT) und den Multi Walled Carbon Nanotubes (MWCNT) unterschieden werden. Während sich die SWCNT wie ein Halbleiter verhalten, verhalten sich die MWCNT wie ein metallischer Leiter. Die Leitfähigkeit ergibt sich aus den freien Elektronen im π -Orbital. Aus diesem Grund ist für den spezifischen Widerstand zusätzlich auch die „Reinheit“ der Carbon Nanotubes entscheidend. Haben die CNT viele Defekte im π -Elektronensystem, z.B. durch Hydroxy-, Carbonyl- oder Carboxylverbindungen, so steigt aufgrund der Defekte der spezifische Widerstand und damit nimmt die Leitfähigkeit ab.

Da in den verwendeten Carbon Nanotubes für ein besseres Emulsionsverhalten Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen eingefügt worden sind und damit Defekte im π -Orbital, war eine geringere Leitfähigkeit der CNT im Vergleich zu Aktivkohle zu erwarten. Dies spiegelt auch die Abbildung 4.1.2 wieder.

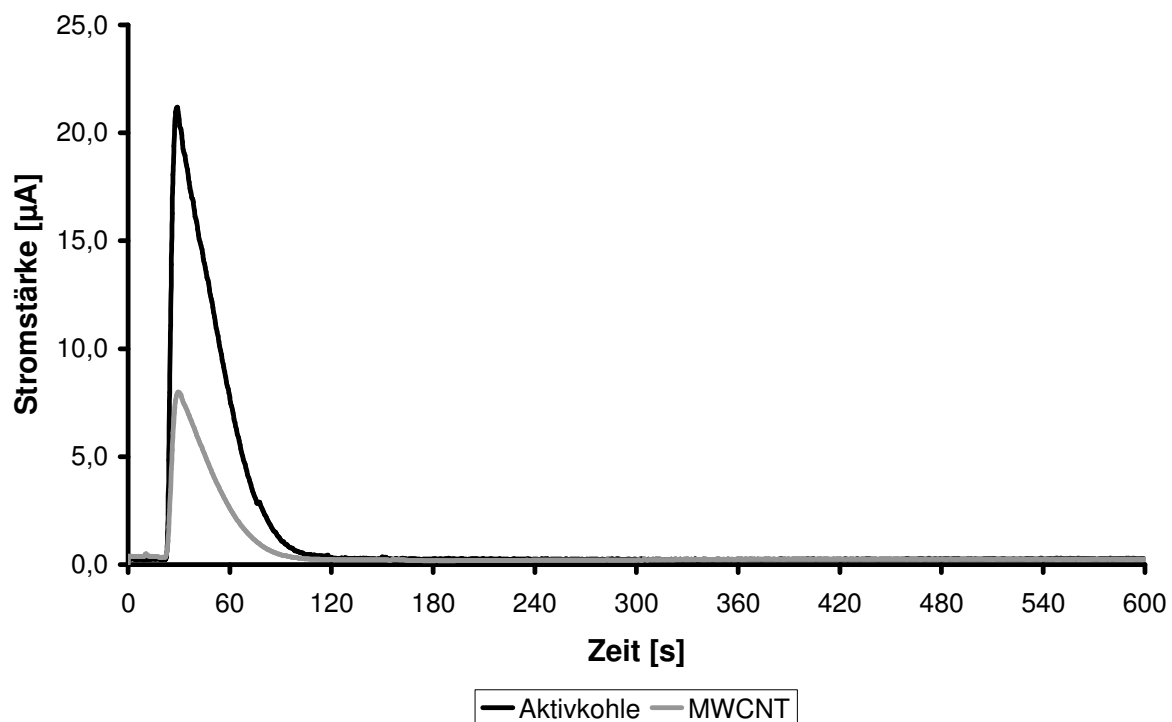


Abbildung 4.1.2 Messung einer Hydrochinon-Lösung $c = 10 \text{ mM}$
 Fließmittel: Citrat-Puffer $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 5$, Potential $E = 280 \text{ mV}$, GC-Elektrode; Probe ohne Enzym

4.2 Immobilisierungsstrategien bei TFT-Sensoren

Da die Elektroden auf den TFT-Sensoren sehr nah zusammen liegen (Abstand Arbeitselektrode – Referenzelektrode ca. 1 mm) und die Arbeitselektrode sehr klein ist (Durchmesser 1 mm), kann es zu Komplikationen während der Beschichtung kommen. Deshalb wurden für die TFT-Sensoren im Gegensatz zu den Makroelektroden verschiedene Immobilisierungsstrategien getestet. Neben der PLA-Beschichtung wurden auch Versuche mit APTES und verschiedenen Photolinkern (FNPA und Sulfo-HSAB) durchgeführt.

4.2.1 Immobilisierung mit PLA

Aufgrund der Dimensionierungen der Elektroden auf den TFT-Sensoren (Abstand Arbeitselektrode – Referenzelektrode < 1,0 mm) ist eine Aufgabe des Polymer-Enzym-Gemisches auf die Elektrode nicht einfach möglich. Es muss darauf geachtet werden, dass es bei der Aufgabe des Polymer-Enzym-Gemisches zu keinem Kontakt mit der Referenzelektrode kommt. Dies würde das Elektrodenpotential verfälschen.

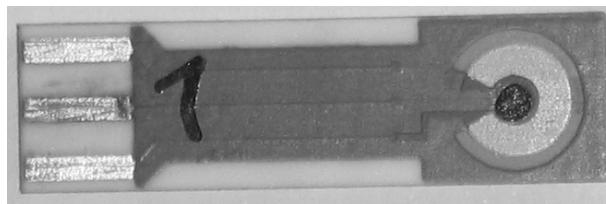


Abbildung 4.2.1 TFT-Sensoren AC1.W5.R1

Die Arbeitselektrode wurde mit einem PLA/Enzym-Gemisch beschichtet.

Da es sich bei dem Polymer-Enzym-Gemisch um eine viskose Substanz handelt, ist eine einfache und repräsentative Aufgabe des Gemisches mittels Pipettieren nicht möglich. Zum einen kann aufgrund der Fließfähigkeit des Gemisches die Probe nicht richtig mit der Pipette aufgezogen werden, zum anderen ist das Aufgeben des Proben-Gemisches auf den TFT-Sensor aufgrund der kleinen Öffnung der Pipettenspitze mit einer bestimmten Dosierung nicht möglich. Daher wurde die Öffnung der Pipettenspitze vergrößert. Dies brachte keine Verbesserung. Weiterhin war die gleichmäßige Aufgabe des Proben-Gemisches nicht unter Wiederholbedingungen möglich.

Eine weitere Möglichkeit das Polymer-Enzym-Gemisch auf den TFT-Sensor aufzubringen besteht darin, eine Nadel oder einen Spatel in das Gemisch zu tauchen und das anhaftende Material auf die Arbeitselektrode aufzutragen. Auch hier ist eine gleichmäßige Aufgabe des Proben-Gemisches nicht möglich, da zum einen entweder eine zu geringe Menge an Proben-Gemisch aufgegeben werden kann (bei der Verwendung einer Nadel) oder aber bei größeren Mengen des Proben-Gemisches das Gemisch tropft (bei der Verwendung eines Spatels). Dies

hängt mit der Fließeigenschaft des Polymer-Enzym-Gemisches zusammen. Auf glatten Oberflächen ist aufgrund des verringerten Reibungswiderstandes die Fließgeschwindigkeit einer viskosen Flüssigkeit größer.

Formel 6

$$F = \eta * A * \frac{dv}{dx}$$

Newton'sches Reibungsgesetz: F = Reibungswiderstand, η = Viskosität, A = Fläche, v = Geschwindigkeit, x = Schichtdicke

Dies ergibt sich bei Flüssigkeiten aus der inneren und äußeren Reibung. Bei konstanter Viskosität und gleicher Fläche hängt die Geschwindigkeit vom Reibungswiderstand ab (siehe Formel 6). Dieser wiederum ist von der äußeren Reibung (Coulomb Reibung) abhängig.

Formel 7

$$F_R = \mu * F_N$$

Coloumb'sches Reibungsgesetz: F_R = Reibungskraft, μ = Reibungskoeffizient, F_N = Normalkraft

Für die äußere Reibung ist der Reibungskoeffizient maßgeblich. Der Reibungskoeffizient wird empirisch ermittelt und hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab (z.B. Oberflächenbeschaffenheit, Materialpaarung, Temperatur). Bei gleichen Bedingungen (Materialpaarung, Temperatur, usw.) hängt somit die Geschwindigkeit einer viskosen Flüssigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit ab. Bei rauer Oberfläche ist die Geschwindigkeit niedriger als bei glatter Oberfläche.

4.2.2 Vergleich der Beschichtungsstrategien mit APTES, Sulfo-HSAB und FNPA

Aufgrund der in 4.2.1 erläuterten Schwierigkeiten bei der Immobilisierung des Enzyms auf die TFT-Sensoren mit PLA wurden weitere Immobilisierungsstrategien untersucht. Zum einen handelt es sich um eine in der Literatur häufig beschriebene klassische kovalente Bindung mit APTES/GDA [Quan 2002, Vandenberg 1991]. Zum anderen handelt es sich um eine Beschichtungsstrategie mit Photolinkern. Dabei wurde die Beschichtung mit Laccase und Glucoseoxidase mit Hilfe des Photolinkers FNPA und dem Photolinkers Sulfo-HSAB getestet.

4.2.2.1 Immobilisierung mit APTES

Bevor eine Immobilisierung der Laccase mit APTES möglich war, musste zuerst die Kohlenstoff-Elektrodenoberfläche behandelt werden. Da APTES zur kovalenten Bindung an

das Trägermaterial einen Reaktionspartner benötigt, wurde die Kohlenstoff-Elektrodenoberfläche mit H_2O_2 unter UV-Licht inkubiert. Die aus dem Wasserstoffperoxid entstandenen Hydroxyl-Radikale führen zur Bildung von Hydroxylgruppen auf der Kohlenstoff-Elektrodenoberfläche (radikalische Substitution am Kohlenstoffatom). Die Hydroxylgruppen können nun mit APTES reagieren und kovalent binden (siehe Abbildung 2.3.4). Dabei entsteht Ethanol, das beim Reinigen der Elektrode entfernt wird. Um die Aminooberfläche zu aktivieren, wurde die Sensoroberfläche mit Glutardialdehyd inkubiert. Dabei bindet eine Carboxygruppe des Glutardialdehyd an die Amino-Gruppe des APTES. Die zweite Carboxygruppe des Glutardialdehyd kann nun mit einer Amino-Gruppe eines Proteins kovalent binden [Nanci, A. et al. 1998].

4.2.2.2 Immobilisierung mit Photolinkern

Bei der Immobilisierung mit Photolinkern gibt es zwei Möglichkeiten, das Enzym auf dem Trägermaterial kovalent zu binden. Zum einem kann man das Enzym zusammen mit dem Photolinker auf die Elektrodenoberfläche aufgeben und dann unter UV-Licht reagieren lassen. Dabei entsteht eine Vernetzung des Photolinkers, der zum Teil auch mit dem Enzym reagiert. Aufgrund der teilweisen Vernetzung der Enzyme mit dem Photolinker sind diese Enzyme nicht unbedingt für die Analyten zugänglich. Damit ist die Empfindlichkeit des Systems reduziert. Zum anderen besteht die Möglichkeit den Photolinker zuerst mit UV-Licht reagieren zu lassen um dann das Enzym kovalent zu binden. Dabei kommt es nur zur Vernetzung des Photolinkers. Das Enzym bindet an den vernetzten Photolinker und ist dadurch für die Analyten zugänglich. Hierbei wird die Empfindlichkeit des Systems nur geringfügig aufgrund der kovalenten Bindung des Enzyms an den Photolinker herabgesetzt.

4.2.2.2.1 Immobilisierung auf Kohlenstoff-Elektroden mit Sulfo-HSAB

Wie in 2.3.11.1 beschrieben, wird Sulfo-HSAB auf die Oberfläche der Arbeitselektrode pipettiert. Unter UV-Licht reagiert das Sulfo-HSAB unter Abspaltung von Stickstoff (N_2) mit dem Kohlenstoff der Arbeitselektrode. Da der Kohlenstoff aufgrund der Graphit-Struktur sp^2 -hybridisiert ist, befindet sich das vierte Elektron in einem p-Orbital. Diese p-Orbitale bilden delokalisierte (p-p) π -Bindungen aus. Das aus dem Sulfo-HSAB entstandene Nitren ist elektrophil und es kann zu einer radikalischen Addition (wenn es sich um ein Triplettnitren handelt) oder zu einer elektrophilen Addition (Singulettnitren) an die Doppelbindungen des Kohlenstoffs kommen [Voigt, 1998]. Damit erhält man eine stabile Bindung des Sulfo-HSAB an die Elektrodenoberfläche.

Das zu immobilisierende Enzym reagiert mit einer Amino-Gruppe durch Substitution der Hydroxysulfosuccinimidyl-Gruppe. Aufgrund der Größe dieser Gruppe kommt es jedoch zu einer sterischen Hinderung mit dem Enzym, so dass eine Bindung im Vergleich zu den anderen Immobilisierungsstrategien seltener zustande kommt. Des Weiteren kann die Hydroxysulfosuccinimidyl-Gruppe aufgrund des reaktiven Sauerstoff-Ions selbst mit dem Enzym reagieren, so dass es zu einer Konformitätsänderung des Enzyms kommt und dadurch die Enzymaktivität gesenkt wird bzw. keine Enzymaktivität mehr vorhanden ist.

4.2.2.2 Immobilisierung auf Kohlenstoffelektroden mit FNPA

Wie in 2.3.11.3 beschrieben, wird FNPA auf die Oberfläche der Arbeitselektrode pipettiert. Unter UV-Licht reagiert das FNPA unter Abspaltung von Stickstoff (N_2) mit dem Kohlenstoff der Arbeitselektrode. Da der Kohlenstoff aufgrund der Graphit-Struktur sp^2 -hybridisiert ist, befindet sich das vierte Elektron in einem p-Orbital. Diese p-Orbitale bilden delokalisierte (p-p) π -Bindungen aus. Das aus dem FNPA entstandene Nitril ist nucleophil und es kommt zu einer nucleophilen Addition an die Doppelbindungen des Kohlenstoffs. Damit erhält man eine stabile Bindung des FNPA an die Elektrodenoberfläche. Das zu immobilisierende Enzym reagiert mit einer Amino-Gruppe durch Substitution des Fluorid-Atoms. Dabei entsteht Flußsäure. Man erhält eine kovalente Bindung des Enzyms auf die Trägeroberfläche. Die gebildete Flußsäure reagiert mit dem verwendeten Lösungsmittel Methanol zu Fluormethan und Wasser. Das gebildete Fluormethan ist bei Raumtemperatur leicht flüchtig (Siedetemperatur bei $-78,4^\circ C$). Somit wird das Fluor weiteren unerwünschten Reaktionen entzogen.

4.2.2.3 Unterschiedliche Ergebnisse aufgrund der Beschichtungsstrategien mit APTES, Sulfo-HSAB und FNPA

Wie in Abbildung 3.3.1 dargestellt, ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Beschichtungsstrategien im Detektionsverhalten festzustellen. Während die Beschichtung mit Sulfo-HSAB keine positiven Ergebnisse lieferte, konnten mit der APTES-Beschichtung und der FNPA-Beschichtung auswertbare Resultate erzielt werden. Dabei ist auffällig, dass bei ähnlicher Standardabweichung die FNPA-Beschichtung eine mehr als fünfmal höhere Empfindlichkeit aufweist als die APTES-Beschichtung.

Aufgrund der Einfachheit der Beschichtungsmethode und der guten Empfindlichkeit im Vergleich zu den anderen untersuchten Methoden, wird die Beschichtung der Arbeitselektrode mit Hilfe von FNPA für weitere Untersuchungen verwendet und als im Vergleich beste Immobilisierungsstrategie eingestuft.

4.2.3 Verwendung unterschiedlicher Elektroden für die FNPA-Beschichtung

Wie unter 4.2.2 beschrieben ist eine Beschichtung mittels FNPA die beste Methode. Diese wurde unter Verwendung einer Kohlenstoff-Arbeitselektrode ermittelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Sensoren waren mit verschiedenen Arbeitselektroden ausgestattet. Während die Sensoren vom Typ AC1.W2.R1 mit einer Platin-Arbeitselektrode ausgestattet waren, waren die Sensoren vom Typ AC1.W4.R1 und AC1.W5.R1 mit Kohlenstoff-Arbeitselektroden ausgestattet. Der Unterschied zwischen AC1.W4.R1 und AC1.W5.R1 liegt ist der Kohlenstoff-Modifikation des verwendeten Kohlenstoffs. Leider war die Hersteller-Firma BVT nicht in der Lage, die genauen Modifikationen mitzuteilen.

Wie aus Abbildung 3.3.2. hervorgeht, sind zwei Dinge bei der Beschichtung der verschiedenen TFT-Sensoren mit zu beobachten. Zum einen hat das verwendete Enzym zur Beschichtung einen entscheidenden Einfluss auf die Empfindlichkeit des Sensors (siehe auch 4.3). Zum anderen ist die höchste Enzymaktivität bei den Sensoren des Typs AC1.W2.R1 gegeben, zumindest wenn man Laccase aus *Trametes versicolor* verwendet.

Es erstaunt nicht, dass die Empfindlichkeit der beiden Kohlenstoff-Arbeitselektroden in ähnlichen Größenordnungen liegt, da man davon ausgehen muss, dass die Kohlenstoff-Modifikationen keinen größeren Unterschied aufweisen (z.B. keine Verwendung von Fullerenen oder Carbon Nanotubes in einer Elektrode und eine Graphit-Modifikation in der anderen Elektrode). Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass es sich um unterschiedliche Graphit-Modifikationen handelt.

Während es bei den verwendeten Laccasen von *Agaricus bisporus* und *Rhus vernicifera* keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung der Platin-Arbeitselektrode gegeben hat, ist die Empfindlichkeit bei der Kombination Laccase aus *Trametes versicolor* und Platin-Arbeitselektrode signifikant größer.

Da die Verwendung von Sensoren mit Platin-Arbeitselektroden mit der Beschichtung der Laccasen *Rhus vernicifera* und *Agaricus bisporus* keinen großen Unterschiede in der Enzymaktivität verglichen mit der Enzymaktivität der Kohlenstoff-Arbeitselektroden beschichtet mit den beiden oben genannten Laccasen erbrachte, kann ausgeschlossen werden, dass die Beschichtungsstrategie mit FNPA ein Grund für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten ist.

Aufgrund des Versuchsaufbaus deuten die Ergebnisse vielmehr darauf hin, dass die Immobilisierung der Laccase aus *Trametes versicolor* der Grund für die erhöhte Enzymaktivität ist.

4.3 Verwendung von Laccasen

Die Verwendung von Laccasen in Biosensoren zur Detektion von Polyphenolen wird in der Literatur häufig beschrieben [Kulys und Vidziunaite, 2003; Quan und Shin, 2004]. Die mit den Biosensoren untersuchten Substanzen reichen von Phenolen über substituierte Phenole, Naphtolen, Hydroxycarbonsäuren, Ascorbinsäuren, DOPA, Eugenol und Hexacyanoferraten bis hin zu Polyphenolen. Als Cosubstrat dient im Allgemeinen Sauerstoff [BRENDA Enzyme Database, 2009]. Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Laccasen, die wiederum unterschiedliche pH- und Temperaturoptima sowie verschiedene Lagerstabilitäten haben, ist die Bestimmung der geeigneten Laccase für den zu entwickelnden Biosensor Voraussetzung für die Bestimmung von Polyphenolen. In dieser Arbeit wurden die Laccasen aus *Trametes versicolor*, *Agaricus bisporus* und *Rhus vernicifera* getestet.

Die Funktionskontrolle des immobilisierten Enzyms erfolgte bei den Makro-Elektroden direkt durch amperometrische Detektion. Im Gegensatz dazu erfolgte die Funktionskontrolle bei den BVT-Sensoren photometrisch mittels ABTS.

4.3.1 Laccase aus *Rhus vernicifera*

Die Laccase aus *Rhus vernicifera* wurde schon 1883 von Yoshida isoliert [Yoshida, 1883] und gehört damit zu den am besten erforschten Laccasen. Da das Temperaturoptimum der Laccase bei 25°C liegt [Casella et al, 2006] und das Enzym bei einer Temperatur von 5°C bei einem pH-Wert von 5,5 in destilliertem Wasser gelagert werden kann [Peisach et al, 1965], ist es für den Einsatz als biologische Komponente eines Biosensors geeignet. Das Enzym lässt sich in einem pH-Bereich von 4,3 bis 9,0 einsetzen, wobei das pH-Optimum bei 7,0 liegt [Casella et al, 2006]. Nach Peisach et al liegt das pH-Optimum des Enzyms zwischen 5,0 und 5,5 bei der Verwendung eines Tris-Acetat-Puffers [Peisach et al, 1965].

Während die Laccasen von *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* auch auf den Makroelektroden mittels amperometrische Detektion getestet worden sind, ist dies mit der Laccase aus *Rhus vernicifera* aufgrund der schlechten Löslichkeit des Enzyms in Pufferlösung nicht erfolgt.

4.3.1.1 Verwendung von Laccase aus *Rhus vernicifera* auf TFT-Sensoren

Obwohl die Laccase im Vergleich zu den Laccasen aus *Trametes versicolor* und *Agaricus bisporus* schlecht löslich ist, wurde ein Versuch mit *Rhus vernificera*-Laccase auf den TFT-Sensoren durchgeführt, da für die Beschichtungsstrategie mit Photolinkern möglichst viele Daten gesammelt werden sollten. Vergleicht man die in 3.3.2 ermittelten Werte für den

Blindwert, den Wert des Sensors ohne Beschichtung und die Werten des Sensors mit Beschichtung von Laccase aus *Rhus vernicifera*, so fällt auf, dass diese Werte im Rahmen der Messunsicherheit identisch sind (siehe Tabelle 25). Dies bedeutet, dass es nicht möglich war, eine Beschichtung mit Laccase aus *Rhus vernicifera* auf den TFT-Sensoren mit den gewählten Immobilisierungsstrategien durchzuführen.

Tabelle 25 Vergleich der ermittelten Absorptionen für den Blindwert, eine Elektrode ohne Beschichtung, eine Elektrode mit nur einer FNPA-Beschichtung und der Beschichtung mit Laccase aus *Agaricus bisporus*; ermittelt wurden die Werte mittels ABTS-Test (siehe auch 3.3.2)

	Blindwert	Ohne Beschichtung	Mit FNPA-Beschichtung	Beschichtung mit Laccase aus <i>Rhus vernicifera</i>
AC1.W2.R1	0,052	0,049	0,046	0,048
AC1.W4.R1	0,052	0,047	0,043	0,047
AC1.W5.R1	0,053	0,047	0,044	0,050

Da die Laccasen von *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* ein Molekulargewicht von 96.000 Da bis 110.000 Da aufweisen, die Laccase von *Rhus vernicifera* jedoch ein Molekulargewicht zwischen 52.000 Da bis 70.000 Da hat, kann sich die Fixierung des Enzyms am Träger unterscheiden. Dies kann dazu führen, dass die Laccasen von *Trametes versicolor* und *Agaricus bisporus* unter Verwendung von FNPA immobilisiert werden können, während die Laccase von *Rhus vernicifera* nicht immobilisiert werden kann. Es besteht die Möglichkeit, dass Laccase von *Rhus vernicifera* aufgrund seiner unterschiedlichen Struktur im Vergleich zu den Laccasen von *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* während des Immobilisierungsvorgang inaktiviert worden ist.

4.3.2 Laccasen aus *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor*

In der Literatur ist beschrieben, dass Laccase aus *Agaricus bisporus* 1,2-Dihydroxybenzen, Pyrogallol, Gallussäure und Ascorbinsäure umsetzt [Wood, 1980]. Das macht sie für die Nutzung als biologische Komponente eines Biosensors zur Detektion von Polyphenolen interessant. Die Laccase hat zwei pH-Optima bei 3,5 und 5,6 [Wood, 1980]. Des Weiteren wurde von Timur et al. gezeigt, dass bei Verwendung von *Agaricus bisporus*-Gewebe (mit Polyanilin als Immobilisierungsreagenz) das pH-Optimum bei 5,5 liegt [Timur et al., 2004]. Im Vergleich dazu hat Laccase aus *Trametes versicolor* ein pH-Optimum bei 3,0 [Han et al., 2005 und Madzak et al., 2006]. Darüber hinaus wurde für immobilisierte Laccase ein pH-

Optimum von 4,3 ermittelt [Rogalski et al., 1990]. Daneben wird in der Literatur auch noch ein pH-Optimum von 5,5 postuliert [Quan, Shin, 2004].

Unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Ergebnisse und den oben genannten Literaturwerten wurde für die Makroelektroden ein Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 gewählt, welcher für beide Laccasen eingesetzt worden ist.

4.3.2.1 Verwendung der Laccasen auf Makroelektroden

Der Vergleich der Laccasen aus *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* wurde bereits in 3.1.4.10 beschrieben. Dabei wurde deutlich, dass die Laccase aus *Agaricus bisporus* im Vergleich zu der Laccase aus *Trametes versicolor* deutlich geringere Werte lieferte (ca. Faktor 20 geringer), was jedoch auch mit einer deutlichen Verringerung der Standardabweichung einhergeht. Die Verringerung der Standardabweichung deutet auf eine höhere Präzision und/oder Robustheit der verwendeten Makroelektrode im Vergleich zu Makroelektroden mit Laccasen aus *Trametes versicolor* hin. Dieser positive Effekt wird jedoch komplett durch die deutlich schlechtere Empfindlichkeit kompensiert. Diese ergibt sich aus der deutlich niedrigeren Aktivität der Laccase aus *Agaricus bisporus* (Aktivität 6,3 U/min) im Vergleich zu der Aktivität der Laccase aus *Trametes versicolor* (Aktivität: 30,6 U/mg). Im Gegensatz zu der oben genannten Streuung, ist die Streuung der Ergebnisse bei der Verwendung der Laccase *Trametes versicolor* signifikant hoch. Dies ist eine Folge der geringeren Robustheit des Messsystems. Dies ergibt sich aus den ermittelten Einzelwerten. Dabei sind bei Wiederholungsmessungen die Signale deutlich geringer als bei der ersten Messung.

Da die Abnahme der Signalstärke bei konstanter Probenkonzentration von Messung zu Messung abnimmt, ist davon auszugehen, dass die beschichtete Arbeitselektrode „vergiftet“ wird. Dies kann die Folge der Abbauprodukte sein, die bei der Messung entstehen. Als Reaktionsprodukt bei der Messung von Hydrochinon entsteht 1,4-Benzochinon, welches mit Biomolekülen wie DNA und Proteinen reagiert [Peter, 1989; McDonald et al., 1993]. Hierbei ist vor allem die Addition von 1,4-Benzochinon an Thiolgruppen des Cysteins zu nennen. Bekannt ist der Effekt der Inhibierung von Enzymen durch Benzochinon zum Beispiel bei Urease, welche mehrere Cystein-Einheiten enthält [Zaborska, W. et al., 2002]. Dies kann zur Reduktion der Signalstärke führen. Da jedoch nach längerer Zeit ohne Messung (bzw. Lagerung der beschichteten Elektrode in Lagerpuffer) die Signalstärke bei der nächsten Messung wieder steigt, kann dies nur ein Aspekt sein.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass das 1,4-Benzochinon polymerisiert und sich als Film über die beschichtete Elektrode legt. Für diese These spricht die oben genannte Erhöhung der

Signalstärke nach längeren Zeiträumen ohne Messung (sowohl im Lagerpuffer als auch im Messsystem). Da sowohl als Lagerpuffer, als auch als Fließpuffer im Messsystem ein Citrat-Puffer Verwendung findet, kann davon ausgegangen werden, dass die Alkoholgruppen des Citrats mit den Carbonylgruppen des Benzochinons zu Halbacetalen oder Acetalen reagiert. Dabei wird das Reaktionsprodukt von der Elektrode gelöst, was eine Erhöhung der Sensitivität und damit der Signalstärke zu Folge hat.

Da aufgrund der großen Standardabweichung und damit geringen Stabilität der beschichteten Makroelektroden ein Produktiveinsatz nicht möglich ist, wurde mit der mit *Trametes versicolor*-Laccase beschichteten Elektrode ein weiteres Mal eine Optimierung des Lager- und Messpuffers durchgeführt. Dazu wurde neben dem bekannten Citrat-Puffer ein Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,0, 0,1 M NaCl) eingesetzt. Die Puffer wurden sowohl als Lagerpuffer als auch als Fließmittel für das Messsystem eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass die Verwendung des Phosphat-Puffers als Fließmittel und des Citrat-Puffers als Lagerpuffer eine deutliche Verbesserung des Signals bei akzeptabler Standardabweichung ergab.

Aufgrund der Reversibilität der Reaktion an der Arbeitselektrode kann davon ausgegangen werden, dass sich bei höheren pH-Werten sich das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Hydrochinons verschiebt und es somit zu einer „natürlichen“ Amplifizierung des Signals kommt. Die Lagerung im Citratpuffer bewirkt wie oben aufgezeigt eine Reaktivierung der beschichteten Elektrode. Beide Effekte führen zu einer ca. siebenfach höheren Signalstärke bei nur marginal größerer Standardabweichung.

4.3.2.2 Verwendung der Laccasen auf TFT-Sensoren

Wie in 3.3.2.1 beschrieben wurden die Laccasen aus *Rhus vernicifera*, *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* auf drei verschiedenen TFT-Sensoren untersucht, wobei die TFT-Sensoren sich in der Arbeitselektrode unterscheiden. Die Ergebnisse der Messungen mit der Laccase aus *Rhus vernicifera* wurden schon im Abschnitt 4.3.1.1 diskutiert.

Auch bei den Untersuchungen mit den Laccasen aus *Agaricus* und *Trametes versicolor* kamen die bekannten drei TFT-Sensoren zum Einsatz, deren Arbeitselektroden aus Platin bzw. aus verschiedenen Kohlenstoff-Modifikationen bestehen. Dabei fällt zuerst auf, dass sich, wie in den Versuchen mit den Makroelektroden bestätigt, dass die Laccase aus *Trametes versicolor* die leistungsfähigste ist. Unabhängig von der verwendeten Arbeitselektrode sind die Signale bei den Versuchen mit der Laccase aus *Trametes versicolor* und damit die Sensitivität des Systems deutlich höher (ca. Faktor 2; bei der Platinelektrode ca. Faktor 3) als beim System TFT-Sensor/Laccase aus *Agaricus bisporus*. Dies lässt sich mit der geringeren Aktivität der Laccase aus *Agaricus bisporus* (6,3 U/mg) im Vergleich zu der Laccase aus *Trametes*

versicolor (30,6 U/mg) erklären. Weiterhin auffällig ist, dass es bei der Verwendung des TFT-Sensors AC1.W2.R1, der eine Platin-Arbeits Elektrode hat, eine signifikante Signalerhöhung im Vergleich mit den beiden TFT-Sensoren mit Kohlenstoff-Arbeits Elektroden bei gleichzeitiger Verwendung der Laccase aus *Trametes versicolor* als Biokomponente gibt. Dies lässt sich nicht ohne weiteres erklären. Wie in 4.2.3 beschrieben kann ausgeschlossen werden, dass der Effekt der Beschichtung für die Signalerhöhung verantwortlich ist. Wenn dies der Fall wäre, müsste auch das Signal der anderen Laccasen, die auf der Platin-Elektrode immobilisiert worden sind, ein höheres Signal aufweisen. Bei der Verwendung der Laccase aus *Agaricus bisporus* ist es jedoch sogar so, dass das Signal mit der Platin-Arbeits Elektrode am geringsten ist (wenn auch nicht signifikant).

Somit muss der Grund für die Signalerhöhung in der Kombination der Laccase mit der Platinelektrode in Verbindung mit dem Immobilisierungsreagenz liegen. Überspannung als Grund kann aufgrund der oben genannten Beobachtungen damit ausgeschlossen werden. Ein Einfluss auf die Sensitivität des Messsystems und die Reaktionen hat jedoch die Kombination aus der verwendeten Elektrode, der verwendeten Laccase und der Verwendung des Fließmittels im System. Hier ist vor allem der pH-Wert des Fließmittels zu nennen. So haben schon Quan et al. beschrieben, dass die Reversibilität der 1,2-Dihydroxybenzen-Oxidation bei höheren pH-Werten größer ist und dies einen Einfluss auf die Sensitivität der Laccase-Elektrode hat [Quan et al., 2004]. Die unterschiedlichen ermittelten Werte für die Laccase-Elektroden (*Trametes versicolor*) mit den Arbeits-Elektroden Platin und Kohlenstoff lassen sich also mit der Kombination pH-Wert des Fließmittels und Elektrode erklären, welche einen Einfluss auf die Sensitivität der Enzym-Elektrode hat.

4.4 Verwendung von Glucoseoxidase

Neben den Laccasen wird in der Literatur auch die Verwendung von Glucoseoxidase zur Verwendung in Biosensoren zur Detektion von Phenolen aufgeführt [Schwarz, 2004]. Wie in 3.1.5 beschrieben wurden deshalb Messungen mit Glucoseoxidase auf den Makroelektroden-Systemen durchgeführt. Eine wesentliche Beobachtung dabei war, dass es bei der Messung mittels Biosensors zu Fronting und Tailing gekommen ist (siehe Abbildung 4.4.1). Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Glucoseoxidase-Biosensor ein deutlich niedrigeres Signal liefert und damit weniger sensitiv als der Laccase-Biosensor ist.

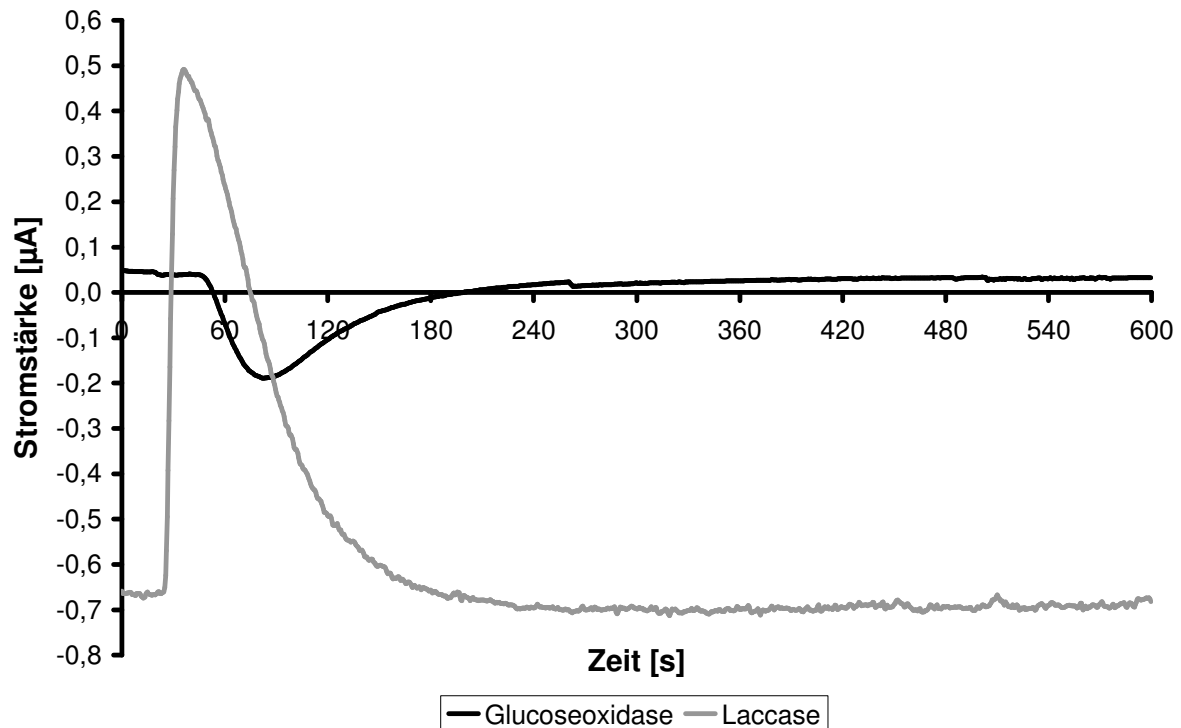


Abbildung 4.4.1 Vergleich der Enzymsysteme Glucoseoxidase/Laccase
 Messung einer 10 mM Hydrochinon-Lösung; Fließpuffer für das Glucoseoxidase-System:
 TRIS-Puffer 0,1 M, pH 7,0; Fließpuffer für das Laccase-System: Citrat-Puffer II

Die großen Signalunterschiede lassen sich unter anderem mit der Spezifität der Enzyme erklären. Während Laccasen spezifisch Polyphenole zu Chinonen umwandeln, ist das Zielsubstrat der Glucoseoxidase die Glucose, bei der eine Hydroxylgruppe in eine Carbonylgruppe umgewandelt wird. Dabei ist Sauerstoff der Reaktionspartner, der zu Wasserstoffperoxid reagiert [Belitz, Grosch, 1992]. Zusätzlich wird in der Literatur die Verwendung von Glucoseoxidase zur Herstellung von Hydrochinon aus Benzochinon beschrieben [Alberti et al., 1982]. Zur Verbesserung des Signals wurde in der Literatur der Zusatz von NADH aufgeführt, um das Hydrochinon zu Benzochinon zu reduzieren und damit der Glucoseoxidase das Benzochinon als Cosubstrat zur Verfügung zu stellen [Schwarz, 2004]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass nicht das komplette Hydrochinon an der Elektrode umgesetzt worden ist, sondern dass das intermediär gebildete Semichinon mit der Glucose zu Arbutin, dem Hydrochinon-Glycosid reagiert hat. Die Komplexität des Systems und damit die Störanfälligkeit des Systems erhöht sich und es kann nicht ausgeschlossen werden kann, dass Hydrochinon durch die Reaktion mit Glucose zu Arbutin reagiert.

Auch wenn die Verwendung von Glucoseoxidase keine Vorteile gegenüber der Verwendung der Laccasen für das Makroelektroden-System brachte, wurde ein Versuch mit Glucoseoxidase durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Langzeitmessung von 75 Minuten, in der verschiedene Kombinationen aus Glucose, NADH und Hydrochinon, sowie

die Einzelsubstanzen vermessen worden sind. In Tabelle 26 sind die einzelnen Messintervalle aufgeführt.

Tabelle 5 Langzeitmessung von verschiedenen Substanzen mittels BVT-Sensor bei einem Potential $E=800$ mV

Von Minute	Bis Minute	Analyt
0	15	Fließmittel: Phosphat-Puffer pH 7, 0,05 M
15	27	Glucose 100 mM
27	35	Hydrochinon 2 mM
35	42	Glucose 100 mM + Hydrochinon 0,2 mM
42	57	Glucose 100 mM + NADH 5 mM
57	67	Hydrochinon 2mM + Glucose 100 mM + NADH 5 mM
67	75	Fließmittel: Phosphat-Puffer pH 7, 0,05 M

In Abbildung 3.3.3 kann man erkennen, dass zur Messung zwar ein stabiler Drift vorhanden ist, dieser jedoch sehr stark ausgeprägt ist. Ein Drift ist in allen amperometrischen Systemen vorhanden. Ein Drift dieser Ausprägung erschwert jedoch die Auswertung von Daten. Grund für den Drift können unter anderem das Auftreten blockierter Grenzflächen, Auflösungs- und Auslaugungserscheinungen oder ein Drift der verwendeten Messwertschaltung sein [Marstalerz, 2003]. Aufgrund der Messergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass nicht gebundenes Enzym oder aber nur adsorptiv gebundenes Enzym durch das Fließmittel abgespült wurde.

Da es sich bei dem Fließmittel und allen vermessenen Analyten um nicht entgaste Flüssigkeiten handelt, kann davon ausgegangen werden, dass sich Sauerstoff in den zu untersuchenden Analyten befindet. Daher wurde angenommen, dass bei der Messung einer 100 mM Glucose-Lösung ein Signal ausgelöst wird, da Glucoseoxidase Glucose zu Gluconsäure umwandelt und im weiteren Schritt Wasserstoffperoxid entsteht, welches bei einem angelegtem Potential von 800 mV reduziert werden sollte [Xu, Chen, 2000]. Es konnte jedoch keine Signaländerung beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass das zuvor immobilisierte Enzym von der Elektrode abgespült worden ist, was auch den Drift in den ersten 15 Minuten erklären kann. Gegen diese These sprechen jedoch die weiteren Signale, die durch verschiedene Lösungen erhalten worden sind. So ist zwar das Signal bei der Messung der 2mM Hydrochinon-Lösung ebenfalls auch ohne Enzym zu erwarten, jedoch kann ohne vorhandenes Enzym nicht der Signalverlauf der Kombinationslösung aus Glucose und Hydrochinon erklärt werden. Aufgrund der ermittelten Werte muss davon ausgegangen

werden, dass die Glucose in der Kombinationslösung eine Amplifizierung des Signals bewirkt, da sich die Signale der Kombinationslösung mit 0,2 mM Hydrochinon nicht wesentlich von der davor gemessenen 2 mM Hydrochinon-Lösung unterscheiden. So unterscheiden sich die beiden Plateaus im Maximum nur um 2,7 μA , während die Signalthöhe bei der Messung der 2 mM Hydrochinon-Lösung 17,4 μA beträgt.

Bei der Verwendung von NADH in Kombination mit Glucose und Hydrochinon wurde erwartet, dass, wie bereits diskutiert, Hydrochinon durch NADH zu Benzochinon oxidiert wird und dabei der Glucoseoxidase als Substrat zur Verfügung steht. Dabei kann bei der Oxidation des Hydrochinons die Glucose mit dem intermediär gebildeten Semichinon zur Arbutin reagieren. Dies wäre eine Erklärung für die verringerte Signalthöhe. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Arbeitselektrode vergiftet ist und dadurch die Signalthöhe deutlich geringer ist, als bei der Messung der Hydrochinon-Glucose-Kombinationslösung. Unter einer vergifteten Elektrode versteht man, dass sich Reaktionsprodukte auf der Elektrode ablagern. Im Allgemeinen kann festgestellt werden, dass es sich bei dem Glucoseoxidase-System um ein deutlich komplexeres System handelt als bei den Laccase-Systemen, was eine geringere Robustheit des Systems zur Folge hat.

4.5 Messungen von Polyphenolen mit Makroelektroden

Neben Hydrochinon wurden auch noch die Substanzen 1,2-Dihydroxybenzen, Gallussäure, Kaffeesäure und DL-DOPA verwendet, um die Empfindlichkeit und Robustheit des Sensors bei den Substanzklassen Diphenole, Benzoessäurederivate, Zimtsäurederivate und Aminosäuren zu untersuchen. Alle untersuchten Substanzklassen weisen zwei Hydroxygruppen am Benzolring auf, entweder in ortho- oder para-Stellung. In Tabelle 27 sind die Werte der berechneten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der analysierten Substanzen aufgeführt.

Aufgrund der Spezifität der Laccase war zu erwarten, dass für die unterschiedlichen Referenzsubstanzen unterschiedliche Empfindlichkeiten und damit unterschiedliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt wurden. Dies konnte auch experimentell bestätigt werden. Dabei können die einzelnen Referenzsubstanzen aufgrund der Position der Hydroxylgruppen und der Seitenketten in verschiedene Gruppen unterteilt werden.

Tabelle 6 Berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für verschiedene Referenzsubstanzen; 95%-Konfidenzintervall

	Messbereich [mM]	Regression	NG [mM]	BG [mM]
Hydrochinon	0,0125 – 0,200	0,9987	0,01506	0,04517
Hydrochinon	0,050 – 0,600	0,9988	0,03671	0,11013
1,2-Dihydroxybenzen	0,100 – 1,000	0,9993	0,04040	0,12012
Gallussäure	0,125 – 2,000	0,9972	0,28	0,860
Kaffeesäure	0,5 – 10,0	0,9973	1,30	3,98
DL-DOPA	0,5 – 1,5	0,9959	0,32	0,80

Fasst man die Referenzsubstanzen in Gruppen zusammen, indem man nur die Position der Hydroxylgruppen unterscheidet (para-Gruppe: Hydrochinon; ortho-Gruppe: 1,2-Dihydroxybenzen, Gallussäure, Kaffeesäure und DL-DOPA), so sind die Ergebnisse für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze und damit der Empfindlichkeiten und Spezifitäten nicht eindeutig. Unterteilt man jedoch die Referenzsubstanzen nach ihren zusätzlichen Seitenketten, so ergibt sich hier ein anderes Bild. Während Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen eine Bestimmungsgrenze von ungefähr 0,05 mM bis 0,12 mM aufweisen, so liegt die Bestimmungsgrenze bei DL-DOPA und Gallussäure im Bereich von 0,8 bis 0,9 mM. Kaffeesäure bildet hier einen Ausreißer mit einer Bestimmungsgrenze von 3,98. Dazu muss erwähnt werden, dass die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen rein rechnerisch erfolgte und die Messwerte einen Einfluss auf die Nachweis- und Bestimmungsgrenze haben. Dies wird auch bei den zwei Hydrochinon-Messungen, bei denen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt worden sind, deutlich. Aufgrund von starken Störungen war es nicht möglich, Kaffeesäure in kleineren Konzentrationsbereichen zu messen. Die Störungen entstehen aufgrund der Bildung von Folgeprodukten an der Elektrode [Renner, 2005].

4.6 Messungen von Polyphenolen mit TFT-Sensoren

Für die Messung von Polyphenolen an den TFT-Sensoren wurden die Referenzsubstanzen Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und Gallussäure verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Kalibriergeraden verwendet. Während die Werte der Referenzsubstanzen Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen wie bei den Makroelektroden mittels Bestimmung der Fläche unterhalb eines Peaks bestimmt worden sind, sind die Gallussäure-Werte für die Kalibriergerade mittels Differenz der Signalhöhe bestimmt worden (siehe Abbildung 3.3.7).

Tabelle 7 Berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für verschiedene Referenzsubstanzen; 95%-Konfidenzintervall

	Messbereich [mM]	Regression	NG [mM]	BG [mM]
Hydrochinon	0,010 – 0,250	0,9994	0,01282	0,04313
1,2-Dihydroxybenzen	0,125 – 5,000	0,9998	0,00933	0,03426
Gallussäure	0,125 – 1,500	0,9986	0,15	0,51

Vergleicht man die ermittelten Werte mit denen der Makroelektrode, so stellt man fest, dass die Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Referenzsubstanzen im selben Konzentrationsbereich liegen, wobei man für alle Referenzsubstanzen niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erhält im Vergleich zu den mit der Mikroelektrode ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Dies gilt auch für die Referenzsubstanz Gallussäure, bei der die Werte mittels Differenz der Signalhöhen ermittelt worden ist. In einem Bereich von 0,125 bis 1,5 mM erhält man einen linearen Verlauf. Erst bei höheren Konzentrationen ist die Linearität nicht mehr gegeben. Ab einer Konzentration von 1,5 mM Gallussäure kann das Enzym die vorhandene Gallussäure nicht mehr vollständig umsetzen. Im Vergleich mit den Makroelektroden fällt bei den TFT-Sensoren zusätzlich auf, dass die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von 1,2-Dihydroxybenzen kleiner ist als die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Hydrochinons. Dies kann aber aufgrund der unterschiedlichen vermessenen Konzentrationsbereiche als statistischer Effekt betrachtet werden. Wie bei den Makroelektroden ist der Einfluss einer Seitenkette am Dihydroxyphenol größer als die Position der Hydroxygruppen an dem Benzolring.

4.7 Messungen von Realproben mit TFT-Sensoren

Die Bestimmung der Polyphenol-Gehalte von Realproben wurde mit (-)-Epicatechin als Referenzsubstanz durchgeführt. Damit beziehen sich alle ermittelten Werte auf (-)-Epicatechin-Äquivalente. Der Bezug auf ein Substanzäquivalent ist nötig, da die Selektivität des Biosensors wie bereits erörtert bei verschiedenen Substanzen unterschiedlich ist. Um die ermittelten Werte vergleichbar zu machen, muss deshalb mit Äquivalenten gearbeitet werden. Als Realproben wurden verschiedene Grüntee-Sorten sowie ein Aroniasaft und ein Cranberrysaft vermessen. Sowohl Grüner Tee, wie auch Aroniasaft und Cranberrysaft sind reich an Polyphenolen und damit ideale Proben zur Vermessung von Polyphenolen. Grüner Tee enthält darüber hinaus wenig andere Substanzen, die die Messungen stören können. Bei den Säften dagegen kann es zu Störungen zum Beispiel durch vorhandenen Zucker kommen.

Die Kalibriergeraden des (-)-Epicatechin zeigen mit einer Regression von 0,9992 eine gute Linearität in den untersuchten Bereichen von 0,1 mg Epicatechin/ 10 ml bis 1,0 mg Epicatechin/ 10 ml sowie von 0,4 mg Epicatechin/10 ml bis 2,4 mg Epicatechin/ 10 ml.

4.7.1 Verschiedene Grüntee-Sorten

Es wurden die Grüntee-Sorten „Chan Mee“, „Gun Powder“ und „Pi Lo Chun“ untersucht. Vergleicht man die Werte, die mit der Referenzmethode ermittelt worden sind, mit denen des Biosensors, so fällt auf, dass die mit dem Biosensor ermittelten Werte deutlich größer sind als die mit der Referenzmethode ermittelten Werte.

Tabelle 8 Vergleich der unterschiedlichen Teesorten; Messung mittels Referenzmethode und Biosensor; alle Werte in „mg Epicatechin/l“

	Referenzmethode		Biosensor		Differenz (absolut)
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	
Tee „Chan Mee“	725,02	27,18	988,75	253,16	263,73
Tee „Gun Powder“	789,66	51,88	1009,72	157,28	220,06
Tee „Pi Lo Chun“	748,60	28,41	1042,64	233,23	294,04

Des Weiteren sind die ermittelten Standardabweichungen, die mit dem Biosensor ermittelt worden, deutlich größer als die mit der Referenzmethode ermittelten Standardabweichungen (Faktor 4-10), wobei die Differenzen in gleicher Größenordnung liegen (siehe Tabelle 29). Dies ist aufgrund der Untersuchungen mit Referenzsubstanzen auch so erwartet worden, da die Referenzmethode robuster sein sollte als der Biosensor. Trotzdem reicht die Präzision des Biosensors aus, um ihn als Screening-Verfahren einzusetzen. Mittelt man die Differenzen der Mittelwerte beider Methoden für die verschiedenen Teeproben, so erhält man einen Wert von 260,28 mg Epicatechin/l. Aufgrund der großen Standardabweichungen der Biosensor-Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass der ermittelte Mittelwert der Differenzen nur ein statistischer Zufall ist. Geht man jedoch von der Annahme aus, dass es sich um einen statistischen Zufall handelt, detektiert der Biosensor Inhaltsstoffe des Tee-Auszugs, die mittels Referenzmethode nicht erfasst werden. In Betracht kommen hier zum Beispiel das im Tee enthaltene Coffein, welches ggfs. an der Elektrode ohne zutun des Enzyms oxidiert wird.

4.7.2 Aroniasaft und Cranberrysaft

Während bei den untersuchten Tee-Proben jeweils der Biosensor höhere Signale und damit höhere Konzentrationen lieferte, ist dies bei den Säften nicht so. Während bei dem Cranberrysaft eine gute Korrelation zwischen Biosensor und Referenzmethode existiert, sind die mit Hilfe der Referenzmethode ermittelten Werte für den Aroniasaft deutlich größer als die Werte, die mit Hilfe des Biosensors ermittelt worden sind.

Tabelle 30 Vergleich der unterschiedlichen Säfte; Messung mittels Referenzmethode und Biosensor; alle Werte in „mg Epicatechin/l“

	Referenzmethode		Biosensor		Differenz (absolut)
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung	
Aroniasaft	5478,69	355,78	3251,18	99,00	2227,51
Cranberrysaft	1137,67	47,44	1357,87	54,52	220,20

Bei den Biosensormessungen sind im Vergleich zu den Teeproben die Standardabweichungen bei den Saftproben deutlich geringer. Aufgrund der Inhaltsstoffe des Aroniasaftes (im Direktsaft sind z.B. bis zu 12 % reduzierende Zucker und zwischen 65-100 g/l Sorbit enthalten [Misfeldt, 2007]) besteht die Möglichkeit, dass die Referenzmethode zu hohe Konzentrationen an Polyphenolen liefert. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die ermittelten Biosensor-Werte zu niedrig ausfallen, wenn die Polyphenole glykosidisch gebunden vorliegen und aufgrund von sterischen Hinderungen nicht mehr vom Enzym umgewandelt werden können. Eine genaue Aussage kann nicht getroffen werden. In der Literatur wird nur ein Polyphenolgehalt von 740 mg/100 g Frischegewicht aufgeführt [Albrecht, 1996]. Für Aronia-Saft sind keine Polyphenolgehalte in der Literatur bekannt. Bei einer möglichen Saftausbeute von 75 bis 80 % [Misfeldt, 2007], errechnet sich ein theoretischer Wert von ca. 590 mg/100 ml. Dies wiederum entspricht dem ermittelten Wert der Referenzmethode.

Die ermittelten Werte für den Cranberrysaft sind miteinander vergleichbar. Auffällig ist, dass der mittels Biosensor ermittelte Wert höher ist als der mittels Referenzmethode. Dies wiederum deckt sich jedoch mit den Untersuchungen der Tee-Proben. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass Substanzen mit dem Biosensor detektiert werden, welche nicht mit der Referenzmethode erfasst werden.

4.8 Stabilität des Biosensors

Die Stabilität des Biosensors lässt sich aus dessen Lagerfähigkeit ableiten. Eine lange Lagerdauer ohne großen Verlust der Sensitivität des Biosensors bedeutet gleichzeitig eine hohe Stabilität des Biosensors. Im Wesentlichen hängt die Stabilität eines Biosensors von zwei Faktoren ab: Wie schnell wird das Enzym vom Biosensor ausgewaschen, also wie gut ist das Enzym auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert. Der zweite Faktor ist, wie gut das Enzym selber stabilisiert wird. Aufgrund der Reaktionen an der Arbeitselektrode und den damit erhaltenen Produkten kann ein Enzym gehemmt werden (Enzymvergiftung). Druck oder Temperatur können das Enzym denaturieren.

4.8.1 Lagerstabilität der mit PLA-beschichteten GC-Elektrode

Um die Stabilität eines Biosensors zu bestimmen gibt es mehrere Möglichkeiten. Für die Enzym/PLA-beschichteten GC-Elektroden wurde die Steigung einer vermessenen Kalibriergerade als Bezugsgröße zur Bestimmung der Lagerstabilität gewählt. Dabei korreliert die Steigung der Kalibriergeraden mit der Sensitivität des Enzymsystems. Je größer die Steigung ist, desto größer ist die Empfindlichkeit des Biosensors. Da die Empfindlichkeit des Biosensors nur von der Enzymaktivität abhängt, lässt sich also eine Aussage über die Enzymaktivität des Biosensors durch die Steigung der Kalibriergeraden treffen. Diese Versuchsanordnung hat den Vorteil, dass man die Enzymaktivität mit den zu untersuchenden Substanzen durchführen kann und keine Ersatzsubstanzen verwenden muss (wie z.B. bei einer photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität). In dieser Arbeit wurde die Lagerstabilität einer mit Enzym/PLA-beschichteten GC-Elektrode über einen Zeitraum von 83 Tagen getestet (siehe Abbildung 3.1.49). Während wie erwartet über den gesamten Zeitraum die Steigung der Kalibriergeraden abnimmt, gibt es doch mehrere Ausreißer, die das Ergebnis nicht eindeutig erscheinen lassen. So ist die Steigung an den ersten beiden Tagen nach der Immobilisierung geringer als an den sechs darauffolgenden Messtagen. Hier wird vermutet, dass aufgrund der Immobilisierung und damit der Konformitätsänderung des Enzyms, die Enzymaktivität gehemmt war. Erst durch erneute Konformitätsänderung in einer zweitägigen Messpause hat das Enzym seine höchste Enzymaktivität in dem System erreicht.

Schaut man sich die ermittelten Steigungen genauer an, so fällt weiterhin auf, dass nach eintägigen Messpausen die Steigung höher liegt als bei den vorherigen Messungen. Es kann davon ausgegangen werden, dass es während der Messungen zur Enzymvergiftung kommt. Des Weiteren deuten die REM-Aufnahmen darauf hin, dass sich während der Messungen eine Schicht auf der PLA/Enzym-Elektrode bildet. Diese Schicht passiviert ebenfalls die

Elektrode. Bei der Lagerung der Elektrode im Puffer können zumindest Substanzen, die das Enzym vergiften, in die Pufferlösung übergehen und das Enzym steht so wieder zur Verfügung. Da dies jedoch nur bei den ersten Messungen relevant ist, sinkt die Enzymaktivität in den darauffolgenden Messungen wieder, da der Zeitraum für einen Übergang von Substanzen in den Lagerpuffer zu kurz ist. Die Passivierungsschicht kann nicht abgebaut werden, so dass allgemein die Steigung der Kalibriergeraden sinkt.

Da das Messsystem nicht temperiert war, ist auch die Temperatur ein Faktor für die Enzymaktivität. Dies erklärt kleinere Schwankungen innerhalb des Diagramms für die Lagerstabilität. Laut Literatur hat Laccase von *Trametes versicolor* ein Temperaturoptimum von 25°C [BRENDA, AMENDA und FRENDA, 2008]. Abweichungen vom Temperaturoptimum senken die Empfindlichkeit des Enzyms. Da die Messungen zum Teil im Hochsommer in nicht klimatisierten Räumen stattgefunden haben, ist hier eine Schwankung der Temperatur von bis zu 10°C nicht auszuschließen ($\pm 5^\circ\text{C}$ vom Temperaturoptimum des Enzyms).

4.8.2 Stabilität des TFT-Biosensors

Im Gegensatz zur GC-Elektrode, in der das Enzym in PLA eingebettet ist, wird das Enzym auf dem TFT-Sensor nur oberflächlich durch den Photolinker auf der Elektrode immobilisiert. Da sich in der Durchflusszelle der Eluenteneinlass genau über der Arbeitselektrode befindet (ähnlich wie bei einer Wall-Jet-Zelle), besteht hier die Möglichkeit, dass das Enzym relativ schnell von der Arbeitselektrode gewaschen wird. Bei der Messung der Lagerstabilität von fünf TFT-Sensoren wurde mittels ABTS die Empfindlichkeit der TFT-Sensoren in einem Zeitraum von 28 Tagen miteinander verglichen, wobei zwischen den Messungen mehrere Tage nicht gemessen worden ist (siehe Abbildung 3.3.14). Dabei korreliert die gemessene Absorption direkt mit der Enzymaktivität. Wider erwarten steigt in diesem Zeitraum die Empfindlichkeit der TFT-Sensoren. Nur von der vorletzten zur letzten Messung fallen die Absorptionen, wobei dies nicht signifikant ist. Der Autor kann nicht erklären, wie es innerhalb eines Zeitraumes von 21 Tagen zur einer Steigerung der Enzymaktivität kommen kann. Aufgrund der Selektivität des verwendeten ABTS-Tests können Störungen jedoch ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Biosensoren sind sowohl in der Industrie (Lebensmittel- und Pharmaindustrie), sowie in den Bereichen medizinische Diagnostik, Biotechnik, Gentechnik sowie Lebensmittel- und Umwelttechnik („Life Sciences“) von immer größer werdender Bedeutung. Sie werden als Quicktests in der Produktion von Lebensmitteln eingesetzt oder bei High-Throughput-Systemen in der Pharmaindustrie. Das Anwendungsgebiet von Biosensoren wächst stetig. Ein großes Feld ist die Anwendung von Biosensoren in biochemischen Analysensystemen (μ TAS – Miniaturized Total Analysis System). Durch die Verwendung von μ TAS können aufgrund der geringen Mengen an Reagenzien Kosten reduziert werden. Aufgrund ihrer hohen Spezifität sind Biosensoren für solche Systeme sehr gut geeignet. Abhängig vom Analyten und der Matrix besteht des Weiteren die Möglichkeit, ohne große Aufreinigungsschritte den Analyten vor Ort zu vermessen. Dies macht Biosensoren für Screening-Methoden vor Ort zu einem interessanten Einsatzgebiet (z.B. die Verwendung von Handheld Units zur Detektion von Substanzklassen in Pflanzen noch am Wachstumsort der Pflanze).

Der entscheidende Schritt bei der Herstellung von Biosensoren ist die Immobilisierung des Enzyms auf der Elektrodenoberfläche. Hierzu gibt es viele verschiedene Herangehensweisen. Wichtig ist für das oben genannte Einsatzgebiet ein sehr robuster Biosensor. Dies verlangt nach einer Immobilisierungstechnik, die das Enzym während der Immobilisierung schützt und seine Aktivität nicht oder nur wenig herabsetzt. Des Weiteren sollte die Immobilisierung das Enzym auch beim Einsatz vor z.B. Auswaschungen schützen, so dass die Biosensoren sowohl in sowohl Mikrofluidik-Systemen verwendet werden können, wie auch für Inline-Messungen in der Produktion von z.B. Lebensmitteln.

Es wurde die Verwendung von Polylactid zur Immobilisierung von Laccase auf Makroelektroden untersucht, um die Makroelektroden als Biosensor für die Analyse von Polyphenolen nutzen zu können. Dabei wurden unterschiedliche Polylactide eingesetzt. Die Unterschiede der Polylactide in den physikalischen Eigenschaften resultieren aus der unterschiedlichen Herstellungsweise, dem eingesetzten Monomer (D-Milchsäure und/oder L-Milchsäure) und der Kettenlänge der Polymere. Die Verwendung von D,L-PLA führte zu keinem Ergebnis, da die Beschichtung entweder nicht auf der Makroelektrode haftete, das D,L-PLA sich nicht in den verwendeten Lösungsmitteln lösen ließ oder das D,L-PLA nach dem Lösen mit den verschiedenen Lösungsmitteln nicht mehr über die nötigen physikalischen Eigenschaften verfügte. Dies scheint eine Folge der Verwendung der D-Milchsäure und L-

Milchsäure als (racemisches) Gemisch zur Herstellung von Polylactid zu sein, da eine Etablierung eines Biosensors mit L-PLA möglich war. Vieles deutet darauf hin, dass Polylactide, die nur aus L-Milchsäure hergestellt worden sind, die beste Wahl zur Immobilisierung von Enzymen auf Sensoroberflächen sind.

Die Herausforderung des Signaltransports vom in PLA eingebetteten Enzym zur Makroelektrode konnte mittels leitfähigen Materials positiv gestaltet werden. Obwohl die Verwendung von Kupfer zu keinem Ergebnis führte, konnte mit Aktivkohle beziehungsweise Carbon Nanotubes der Signaltransport vom Enzym zur Elektrode hergestellt werden. Da die Verwendung von Single Walled Carbon Nanotubes gegenüber den Multi Walled Carbon Nanotubes zu noch besserer Leitfähigkeit des Signals vom gekoppeltem Enzym zur Elektrode führen sollte (aufgrund der besseren Leitfähigkeit der SWCNT gegenüber den MWCNT), kann mit einer Verbesserung der Signal-Empfindlichkeit gerechnet werden. Dabei besteht die Möglichkeit, dass es auch zu einer Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die einzelnen Substanzen kommen kann.

Eine Verbesserung der Empfindlichkeit könnte auch durch die Verwendung von anderen Laccasen möglich sein. In dieser Arbeit wurden Laccasen von *Rhus vernicifera*, *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* verwendet. Dabei zeigte die Laccase aus *Trametes versicolor* das beste Ansprechverhalten für die Modellanalyten im Biosensor. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Laccasen zu einer weiteren Verbesserung des Signals führen können. Im Gegensatz hierzu zeigte die Verwendung von Glucoseoxidase keine Verbesserung der Empfindlichkeit des Sensors. Auch die Verwendung von Mediatoren führte bei der Verwendung von Glucoseoxidase zu keinen Verbesserungen. Inwieweit die Verwendung von Mediatoren eine Verbesserung der mit Laccase beschichteten Sensoren erbringen würde, kann nicht abschließend beurteilt werden.

Es wurden die Modellanalyten Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen, Gallussäure, Kaffeesäure und DL-DOPA vermessen. Dabei wurden Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen als Modellanalyten für die Gruppe der Diphenole verwendet, Gallussäure als Modellanalyt für die Gruppe der Benzoessäurederivate, Kaffeesäure als Modellanalyt für die Gruppe der Zimtsäurederivate und DL-DOPA als Modellanalyt für Aminosäuren. Während Hydrochinon erwartungsgemäß die niedrigsten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aufweist (jedoch in Abhängigkeit des vermessenen Konzentrationsbereichs), gab es zwei unerwartete Ergebnisse für die übrigen Analyten. Obwohl erwartet worden ist, dass 1,2-Dihydroxybenzen eine ähnlich Nachweis- und Bestimmungsgrenze aufweist wie das Hydrochinon, ist festzustellen,

dass die Werte deutlich höher liegen. So konnten sogar für die Gallussäure und für das DL-DOPA niedrigere Grenzen bestimmt werden. Des Weiteren ist auffällig, dass die Unterschiede in der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zwischen DL-DOPA und Kaffeesäure sehr groß sind, obwohl die Molekülstruktur mit Ausnahme der Aminogruppe beider Substanzen identisch ist. Erwartet wurde, dass die Grenzen für die Kaffeesäure deutlich niedriger sind als für das DL-DOPA. Dies ist jedoch genau umgekehrt. Die Kaffeesäure hat im Vergleich aller getesteten Substanzen die höchste Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

Eine beschichtete Makroelektrode wurde über einen Zeitraum von 83 Tagen benutzt (Lagerung der Elektrode in Citrat-Puffer pH 5 bei +4°C). Es wurde an verschiedenen Tagen Kalibriergeraden erstellt. Über die Steigung der Kalibriergeraden kann man nun eine Aussage über die Empfindlichkeit des Systems machen. Je größer die Steigung, desto empfindlicher ist das System. Es sind zwei Punkte besonders auffällig. An den ersten beiden Tagen nach der Immobilisierung des Enzyms ist die Empfindlichkeit des Systems deutlich geringer als auf den darauffolgenden Tagen. Des Weiteren fällt auf, dass, trotz eines Verlustes der Empfindlichkeit über den gesamten Zeitraum, die Empfindlichkeit an den einzelnen Messtagen stark unterschiedlich ist. Dies deutet daraufhin, dass äußere Parameter einen Einfluss auf die Untersuchungen haben.

Da die Verwendung von PLA als Immobilisierungsreagenz auf den getesteten TFT-Sensoren nicht möglich war, wurde die Beschichtung von Laccase auf die Arbeitselektrode der TFT-Sensoren mit Hilfe des Systems APTES/GDA und mit Hilfe der Photolinker Sulfo-HSAB und FNPA untersucht. Im direkten Vergleich der Beschichtungsmethoden stellte die Beschichtung mit FNPA die beste Möglichkeit dar. Während es bei den Versuchen mit Sulfo-HSAB anscheinend zu keiner Bindung des Enzyms auf die Arbeitselektrode erfolgte, war die Beschichtung mit APTES/GDA erfolgreich. Vergleicht man jedoch das Ergebnis der Beschichtung mit APTES/GDA mit dem Ergebnis der Beschichtung mit FNPA, so stellt man fest, dass der mit FNPA beschichteten Sensor eine viermal höhere Laccase-Aktivität aufweist als der mit APTES/GDA beschichtete Sensor.

Die Beschichtungsstrategie mit FNPA wurde mit unterschiedlichen TFT-Sensoren getestet. Dabei handelte es sich um zwei TFT-Sensoren, die als Arbeitselektrode Kohlenstoff verwendeten (in unterschiedlicher Modifikation), und um einen TFT-Sensor, bei dem als Arbeitselektrode Platin verwendet worden ist. Gleichzeitig wurde wie bei den Makroelektroden getestet, welches Enzym die höchste Aktivität nach der Beschichtung

aufweist. Im Vergleich zu den TFT-Sensoren, die eine Kohlenstoff-Arbeits Elektrode hatten, ist die Aktivität der Laccase bei dem TFT-Sensor mit Platin-Arbeits Elektrode signifikant größer. Dies gilt für alle getesteten Laccasen. Wie bei den Makroelektroden konnte festgestellt werden, dass die Beschichtung der TFT-Sensoren mit der Laccase von *Trametes versicolor* die höchste Aktivität aufweist (bei allen verwendeten TFT-Sensoren mit unterschiedlicher Arbeits Elektrode). Da sowohl die Referenzelektrode, wie auch die Arbeits Elektrode von dem System der Makroelektroden abwichen, wurde ein cyclisches Voltammogramm durchgeführt, um das Potentialoptimum zur Detektion von Polyphenolen festzustellen. Das Potentialoptimum für die TFT-Sensoren ist mit 670 mV deutlich unterschiedlich zu dem Potentialoptimum von 280 mV für die Makroelektroden.

Auch für die TFT-Sensoren wurde zunächst mit Modellanalyten getestet. Bei den Analyten handelte es sich um Hydrochinon, 1,2-Dihydroxybenzen und Gallussäure. Hier ist das Ergebnis wie erwartet. Während Hydrochinon und 1,2-Dihydroxybenzen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im gleichen Konzentrationsbereich haben, ist die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für Gallussäure um einen Faktor 10 größer. Bei der Vermessung der Realproben wurde (-)-Epicatechin als Referenzsubstanz eingesetzt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist um einen Faktor 1000 größer als die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für Hydrochinon oder 1,2-Dihydroxybenzen. Vergleicht man die ermittelten Ergebnisse der Tee-Proben der Referenzmethode mit der Biosensor-Methode fallen zwei Dinge besonders auf: Zum einem sind die ermittelten Werte der Biosensormethode im Schnitt um ca. 260 mg Epicatechin/l höher als die ermittelten Referenzwerte. Zum anderen sind die Standardabweichungen der Biosensormethode bis zum Faktor 10 größer als die Standardabweichungen der Referenzmethode. Wie erwartet ist bei den Tee-Proben die Referenzmethode robuster als der Biosensor. Jedoch erhält man vergleichbare Ergebnisse. Dass der durch den Biosensor ermittelte Polyphenolgehalt höher liegt als die ermittelten Werte der Referenzmethode, überrascht. Hier müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Ursache dafür festzustellen. Für die Saft-Proben ist das Bild inhomogener. Während die Biosensor-Ergebnisse für den Cranberrysaft identisch sind mit dem Ergebnis der Referenzmethode und in diesem Fall die Standardabweichung der Biosensor-Methode kleiner ist als die der Referenzmethode (wenn auch nicht signifikant), weisen die Ergebnisse der Messungen des Aroniasaftes einen größeren Unterschied auf. Dafür ist die Standardabweichung der Biosensor-Messung signifikant kleiner als die Standardabweichung der Referenzmethode. Hier müssten noch weitere Untersuchungen erfolgen. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen kann davon

ausgegangen werden, dass der Biosensor eine gute Methode für das Screening auf Polyphenole ist.

Die Lagerstabilität der Sensoren wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen getestet, wobei einmal pro Woche die Aktivität der Laccase mit Hilfe des ABTS-Tests überprüft worden ist. Im Gegensatz zu den Makroelektroden lässt sich über den oben genannten Zeitraum kein eindeutiger Trend feststellen. Es scheint zumindest so, dass in den letzten zwei Wochen eine Abnahme der Enzymaktivität zu beobachten ist. Innerhalb der ersten zwei Wochen scheint jedoch die Enzymaktivität zuzunehmen. Auch zwischen den unterschiedlichen Sensortypen (unterschiedliche Arbeitselektroden) gibt es hier nur ein inhomogenes Bild. Es scheint jedoch so, dass die Enzymaktivität über einen Zeitraum von vier Wochen am stärksten auf den TFT-Sensoren mit Kohlenstoff-Arbeitselektrode erhalten bleibt.

Durch die durchgeführten Untersuchungen zur Detektion von Polyphenolen konnten die Ziele der Arbeit zum großen Teil erreicht werden. Die Verwendung von PLA als Immobilisierungsstrategie für Makroelektroden konnte erfolgreich getestet werden. Jedoch ist die Robustheit und Empfindlichkeit des Biosensors auf Basis der PLA-Beschichtung noch verbesserungswürdig. Die Verwendung von PLA auf TFT-Sensoren konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Jedoch brachten die Untersuchungen mit dem Photolinker FNPA erfolgversprechende Resultate. Dies konnte auch mittels Realproben bestätigt werden. Auch hier wäre eine höhere Empfindlichkeit gepaart mit einer höheren Robustheit zweifellos wünschenswert. Beide Methoden sind jedoch als Screening-Verfahren durchaus einsetzbar. Gerade beim Einsatz vor Ort ohne große Möglichkeiten zur Aufreinigung der Proben haben beide Methoden aufgrund ihrer leichten Handhabbarkeit und des geringen Verbrauchs an Chemikalien ihre Berechtigung.

6 Literaturverzeichnis

Abraham, J. „Functionalization of Carbon Nanotubes”, Dissertation, Institut für Organische Chemie, Universität Erlangen-Nürnberg (2005)

Ajioka, M., Enomoto, K., Suzuki K., and Yamaguchi A. „Basic Properties of Polylactid Acid Produced by the Direct Condensation Polymerization of Lactic Acid” *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 68 (8), 2125-2131 (1995)

Albrecht, H-J. „Wildobst - auch für Gärten interessant“ *Deutsche Baumschule* 48, 725 – 731 (1996)

Alcock, S.J. and Turner, A.P.F. „Continuous analyte monitoring to aid clinical practice” *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, June, July, 319-325 (1994)

Baltes, W. „Lebensmittelchemie“, 5., vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 389-392 (2000)

Bard, A.J. and Faulkner, L.R. „Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications” John Wiley and Sons, New York, 780 S. (1980)

Belitz, H.-D., Grosch, W. „Lehrbuch der Lebensmittelchemie“, 4., überarbeitete Auflage, korrigierter Nachdruck, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1992)

Bischof, C., Mat.-Wiss. und Werkstofftech., 24, 33-412 (1993)

Bokuchava, M.A., Skobeleva, N.I. „The chemistry and biochemistry of tea and tea manufacture” *Advances in Food Research*, 17, 215-292 (1969)

Bos, E.S., van der Doelen, A. A., van Roy, N., Schuurs, A. H. W. M. „3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as an Ames Test Negative Chromogen for Horse-Radish Peroxidase in Enzyme-Immunoassay” *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2, 187-204 (1981)

Bullock, C. „Immobilised enzymes” *Journal of Chemical Education*, 26 (6), 179-182 (1989)

Carlsson, G.H., Nicholls, P., Svistunenko, D., Berglund G.I., Hajdu, J. „Complexes of horseradish peroxidase with formate, acetate and carbon monoxide“ *Biochemistry*, 44, 635 (2005)

Casella, L., Gullotti, M., Monzani, E., Santagostini, L., Zoppellaro, G., Sakurai, T. „Enzymatic and spectroscopic studies on the activation or inhibition effects by substituted phenolic compounds in the oxidation of aryldiamines and catechols catalyzed by *Rhus vernicifera* Laccase“ *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 2127-2139 (2006)

Cass, A.E.G., Francis, D.G., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L. and Turner, A.P.F. „Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose“ *Analytical Chemistry*, 56, 667-671 (1984)

Chang, A., Scheer M., Grote A., Scohmburg, I., Schonburg D. „BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009“ *Nucleic Acids Res.* 37, Database issue, D588-D592 (2009)

Chenxin, C., Jing. C., „Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes“ *Analytical Biochemistry*, 332, 75-83 (2004)

Clark, L.C. Jnr. „Monitoring and control of blood and tissue oxygen“ *Transaction- American Society for Artificial Internal Organs*, 2, 41-48 (1956)

Clark, L.C. Jnr. und Lyons, L. „Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45 (1962)

Clemens, A.H., Chang P.H. und Myers, R.W. „Development of an automatic system of insulin infusion controlled by blood sugar, its system for the determination of glucose and control algorithms“ [Übersetzt, Artikel in Französisch] *Journes Annales de Diabetologie de L'Hotel-Dieu*, Paris, 269-278 (1976)

Cooney, C.L., Weaver, J.C., Tannebaum, S.R., Faller, S.R., Shields, D.V. und Jahnke, M. In: „*Enzyme Engineering*“ (Eds. E.K. Pye and L.B. Wingard Jnr.), 2, 411-417, Plenum New York (1974)

De Bruyne, N.A., „The nature of adhesion” *Aircraft Engineer*, 18(12), 51-54 (1939)

Derjaguin, B.V, Landau L.D., „Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes.”, *Acta Physicochimica URSS*, 14, 633-662 (1941)

Dennison, M.J. and Turner, A.P.F. „Biosensors for environmental monitoring” *Biotechnology Advances*, 13 (1), 1-12 (1995)

Deutsches Lebensmittelbuch „Leitsätze für Tee, teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen“ (1998, zuletzt geändert 1999)

Deutscher Teeverband e.V. „Tee als Wirtschaftsfaktor 2010“, Hamburg, S. 3 (2010)

Divis, C. „Remarks on ethanol oxidation by an “*Acetobacter xylinum*” microbial electrode” [Übersetzt, Artikel in Französisch] *Annals of Microbiology* 126A, 175-186 (1975)

Eggins, B.R. „Biosensors: an introduction”, Teubner, Stuttgart, 224 p. (1996)

Franke, W. „Nutzpflanzenkunde“ Thieme Verlag Stuttgart New York (1997)

Friedrich, G. und Schuricht, W. „Seltenes Kern-, Stein- und Beerenobst“, Neumann Verlag, Leipzig – Radebeul (1985)

Garlotta, D. „A Literature Review of Poly(Lactic Acid)” *Journal of Polymers and the Enviroment*, 9, 2, 63-84 (2001)

Gerthsen, Vogel „Physik” 17. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1993)

Gomes, S.A.S.S. und Rebelo, M.J.F. „A New Laccase Biosensor for Polyphenols Determination” *Sensors*, 3, 166-175 (2003)

Goyanes S., Rubiolo, G.R., Salazar A., Jimeno A., Corcuera M.A., Mondragon I. „Carboxylation treatment of multiwalled carbon nanotubes monitored by infrared and ultraviolet spectroscopies and scanning probe microscopy” *Diamond & Related Materials*, 18, 412-417 (2007)

Graham, H.N. „Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry” *Preventive Medicine*, 21, 334-350 (1992)

Guilbault, G.G. und Montalvo, J. „A urea specific enzyme electrode“ *Journal of the American Chemical Society*, 91, 2164-2569 (1969)

Guilbault, G.G. „Enzyme electrode probes”, *Methods in Enzymology*, 137, 14-29 (1988)

Haase, H.-J. „Praxis der Elektroanalytischen Messtechnik“, Books on demand GmbH, 292 S. (2002)

Haghighi, B., Gorton L., Ruzgas T., Jönsson L.J. „Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis“ *Analytical Chimica Acta*. 487, 3-14 (2003)

Hahn A, Ströhle A, Wolters M. „Sekundäre Pflanzenstoffe – die neuen „Vitamine“?“ *Deutsche Apotheker Zeitung*, 145, 73-81 (2005)

Hajdok, S. „Laccase-katalysierte Dominoreaktionen von Brenzcatechinen und Hydrochinon mit 1,3-Dicarbonylverbindungen“, Dissertation, Institut für Chemie, Hohenheim (2012)

Hall, E.A.H. „Biosensoren”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 417 S. (1995)

Han, M.J., Choi, H.T., Song, H.G. „Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*” *The Journal of Microbiology*, 43, 555-560 (2005)

Harris, P.J.F. „Fullerene-related structure of commercial glassy carbons” *Philosophical Magazine*, 84, 29, 3159-3167 (2004)

Hartmeier, W. „Immobilisierte Biokatalysatoren“ Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1986)

Hartmann, M. „Neue Ansätze in der biomolekularen Interaktionsanalyse unter besonderer Berücksichtigung pharmazeutischer und lebensmittelchemischer Fragestellungen“, Dissertation, Institut für Pharmazeutische Biologie, Bonn (2004)

Hauser, P., Kappes, T. „Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and application to inorganic species“ *Journal of Chromatography* 834, 89-101 (1999)

Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D., Schomburg, D. „Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution“ *Journal of Molecular Biology*, 229, 153-172 (1993)

Henze, G. „Polarographie und Voltammetrie: Grundlagen und analytische Praxis“ 1. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 22-45 (2001)

Jospehy P.D., Eling T., Mason R.P. „The horseradish peroxide-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates” *Journal of Biological Chemistry*, 257, 3669-3675 (1982)

Keusgen, M. „Biosensorische Methoden zur Quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden“, Shaker Verlag, Aachen, 152 S. (1999)

Kissinger, P.T. und Heineman, W.R. „Cyclic voltammetry“ *Journal of Chemical Education*, 60 (9), 702 (1983)

Kleine J., Kleine H. „Über hochmolekulare, insbesondere optisch aktive Polyester der Milchsäure. Ein Beitrag zur Stereochemie makromolekularer Verbindungen.“ *Die Makromolekulare Chemie*, 30, 23-38 (1959)

Kress-Rogers, E. „Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food and the Environment”, CRC Press, Boca Raton, USA, 720 S. (1996)

Kuhnke, M., Lippert, Th., Ortelli, E., Scherer, G.G., Okaun, A.W. „Microstructuring of glassy carbon: comparison of laser machining and reactive ion etching” *Thin Solids Films*, 453-454, 36-41 (2004)

Kulys, J. and Vidziunaite, R. „Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination.” *Biosensor and Bioelectronics*, 18, 319-325 (2003)

Latnser, P. „Neue Realitäten bei Functional Food“ *Lebensmittel-Industrie*, 11/12, 13-15 (2007)

Liedberg, B., Nylander, C. and Lundström, I. „Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing” *Sensors and Actuators*, 4 (2), 299-304 (1983)

Lubbers, D.W. und Opitz, N. „Die pCO₂/pO₂-Optode: eine neue pCO₂ bzw. pO₂-Messsonde zur Messung des pCO₂ oder pO₂ von Gasen oder Flüssigkeiten“ *Zeitschrift für Naturforschung C: Biosciences*, 30c, 532-533 (1975)

Luniak, M. <http://www.avt.et.tu-dresden.de/forschung/arbeitsgebiete/dickschichttechnik> (abgerufen am 21.02.2012)

Madzak, C., Mimmi, M.C., Caminade, E., Brault, A., Baumberger, S., Briozzo, P., Mougin, C., Jolivat, C. „Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis” *protein engineering design & selection*, 19, 77-84 (2006)

Marstalerz, J. „Einfluß der Polymermatrix auf Eigenschaften membranbedeckter potentiometrischer Mikrosensoren”, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Universität Halle-Wittenberg, 2003

McDonald, T.A., Waidyanantha, S., Rappaport, S.M. „Measurement of adducts of benzoquinone with haemoglobin and albumin” *Carcinogenesis*, 14 (9), 1927-1932 (1993)

Migneault, I., Dariguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C. „Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking“ *BioTechniques*, 37, 790-802 (2004)

Milka, P., Krest, I. and Keusgen, M. „Immobilization of alliinase on porous aluminium oxide“ *Biotechnology and Bioengineering*, 69 (3), 344-348

Misfeldt, Ch. „Gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe der Aronia melanocarpa“, Diplomarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 2007

Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I. „„Blue“ Laccases“ *Biochemistry (Moscow)*, 72 (10), 1136-1150 (2007)

Mosbach, K. und Danielsson, B. „An enzyme thermistor“ *Biochemica and Biophysica Acta*, 364 (1), 140-145 (1974)

Nanci, A., Wuest, J.D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S. und McKee, M.D. „Chemical Modification of Titanium Surfaces for Covalent Attachment of Biological Molecules“ *Journal of Biomedical Materials Research*, 40, 324-335 (1998)

Natureworks® PLA Film Technical Bulletin „Printing and Laminating“ (2010)

Nikolova, D. „Charakterisierung und Modifizierung der Grenzflächen im Polymer-Metall-Verbund“ Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Universität Halle-Wittenberge (2005)

Quan, D. , Kim, Y. , Yoon, K. , Shin, W. „Assembly of Laccase over Platinum Oxide Surface and Application as an Amperometric Biosensor“ *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23, 3, 385 (2002)

Quan D., Shin W. „Modification of electrode surface for covalent immobilization of Laccase“ *Materials Science and Engineering*, C 24, 113-115 (2004)

Quan D., Shin W. „Amperometric Detection of Catechol on Catecholamines by Immobilized Laccase from DeniLite“ *Electroanalysis*, 16, 19, 1576-1582 (2004)

Peisach, J., Levine, W.G. „A comparison of the enzymic activities of pig ceruloplasmin and *Rhus vernicifera* laccase” *The Journal of Biological Chemistry*, 240, 2284-2289 (1965)

Peter, M.G. „Chemische Modifikation von Biopolymeren durch chinone und Chinonmethide” *Angewandte Chemie*, 101, 5, 572-587 (1989)

Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. „Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers” *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37663 (2002)

Renner, K. „Poly-N-vinylamid-modifizierte Elektrode als Komponente eines spektroelektrochemischen Sensors für Catecholderivate“ Dissertation Universität Aachen (2005)

Ritter, G. „Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben – Der Einfluss moderner Verfahrenstechnologie auf die Qualität des Endprodukts“ Dissertation Universität Gießen (1994)

Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., Leonowicz, A. „Purification and immobilization of the inducible form of extracellular Laccase of the fungus *Trametes versicolor*” *Acta Biotechnologica*, 10, 261-269 (1990)

Ruiz, A.I., Malavé, A.J., Felby, K., Griebenow, K. „Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents” *Biotechnology Letters*, 22, 3, 229-233 (2000)

Ruzicka, J. und Hansen E.H. „Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis” *Analytica Chimica Acta*, 78, 145 (1975)

Sadhasivam, S., Savitha S., Swaminathan, K., Ling Feng-Huei „Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1” *Process Biochemistry*, 43, 736-742 (2008)

Scheller, F.W., Wollenberger, U., Warsinke, A., Lisdat, F. „Research and development in biosensors“ *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 35-40 (2001)

Schlesier, K. „Untersuchungen zum Polyphenolspektrum und zur antioxidativen Aktivität von Tee und zu Wechselwirkungen von Teepolyphenolen mit Eisen“ , Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Jena (2002)

Schwarz, M.A. „Enzyme-catalyzed amperometric oxidation of neurotransmitters in chip-capillary electrophoresis“ *Electrophoresis*, 25, 12, 1916-1922 (2004)

Shichiri, M., Kawamori, R., Yamasaki, R., Hakai, Y. und Abe, H. „Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor“ *Lancet*, ii, 1129-1131 (1982)

Singelton, V.L., Rossi, J.A. Jr „Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents“ *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158 (1965)

Skoog D.A., Leary J.J „Instrumentelle Analytik“ 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 528-546 (1992)

Stein, K. „Enzyme – Werkzeuge in der analytischen Chemie“ *Nachrichten aus der Chemie Technik und Laboratorium*, 44, 886-890 (1996)

Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. „Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification“ *Pure and Applied Chemistry*, 71 (12), 2333-2348 (1999)

Timur, S., Pazarlioglu, N., Pilloton R., Telefoncu, A. „Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix“, *Sensors and Actuators*, B 97, 132–136 (2004)

Turkova, J. „Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and functions“ *Journal of Chromatography B*, 722, 11-31 (1999)

Turner, A.P.F., Karube, I. und Wilson, G.S. „Biosensors: Fundamentals and Applications“, Oxford University Press, Oxford, 770 p. (1987)

Turner, A.P.F. „Advances in Biosensors“, I, JAI Press, London, UK, 296 p. (1991)

Turner, A.P.F. „Advances in Biosensors“, II, JAI Press, London, UK, 344 p. (1992)

Turner, A.P.F. „Advances in Biosensors“, Suppl. I, JAI Press, London, UK, 265 p. (1994)

Turner, A.P.F. „Advances in Biosensors“, III, JAI Press, London, UK, 216 p. (1995)

Vandenberg, E., Elwing, H. „Protein immobilization of 3-aminopropyl triethoxy silane/glutaraldehyde surfaces: Characterization by detergent washing“ *Journal of Colloid and Interface Science*, 143, 2, 327-335 (1991)

Vlcková, M., Schwarz, M.A. „Enzymatic sensitivity enhancement of biogenic monoamines on a chip“ *Electrophoresis*, 26, 2701-2707 (2005)

Voelkl, K.P., Opitz, N. und Lubbers, D.W. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 301, 162-163 (1980)

Voigt, A. „Zur Chemie photolytisch generierter Arylnitrene in Polymermatrizen“ Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin (1998)

Welinder, K.D. „Covalent Structure of Glycoprotein Horesradish Peroxidase (EC 1.11.1.7)“ *FEBS Letters*, 72, 19-23 (1976)

Weetall, H.H. „Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports“ *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 41, 157-188 (1993)

Wei, Z., Chulho, S., Pehrsson, P.E. „Water-Soluble and Optically pH-Sensitive Single-Walled Carbon Nanotubes from Surface Modification” *Journal of the American Chemical Society*, 124, 12418-12419 (2002)

White, S.F. and Turner, A.P.F. In: „Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation” (Eds. M.C. Flickinger and S.W. Drew). Wiley, New York, USA, 2756 S. (1997)

Wood, D.A. „Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*” *Journal of General Microbiology*, 117, 327-338 (1980)

Xu, J.J., Chen H.Y., „Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized in electrochemically generated poly(ethcridine)” *Analytical Chimica Acta*, 423, 101-106 (2000)
Yoshida, H. „Chemistry of lacquer (urushi).” *Journal of the Chemical Society*, 43, 472-486 (1883)

Zaborska, W., Kot, M., Superata, K. “Inhibition of Jack Bean Urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the Inhibition Mechanism” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17 (4), 247-253 (2002)

Zheng W. und Wang S.Y. „Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries and Lingonberries” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51 (2), 502-509 (2003)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sascha Gabriel Schmidt
Geboren: 09.07.1975 in Köln
Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule „Schlossstrasse“ Troisdorf
1986-1996 Gymnasium „Zum Altenforst“ Troisdorf
Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

1996-1997 Sanitätstrupp 2, I. Luftwaffenausbildungsregiment I, Budel / NL

Studium:

10/1997-11/2002 Studium der Lebensmittelchemie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Abschluss: 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

Praktisches Jahr:

12/2002-02/2003 Fachlabor zur Qualitätssicherung und Kontrolle von Lebensmitteln GmbH, Aachen
03/2003-04/2003 Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt des Kreises Heinsberg, Heinsberg
05/2003-11/2003 Chemisches und Lebensmitteluntersuchungsamt der Stadt Aachen, Aachen
01/2004 2. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

Promotionsstudium:

02/2004-03/2008 Promotionsstudium unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg

Berufspraxis:

05/2008-06/2008 Wissenschaftliche Hilfskraft bei Dr. Fintelmann und Meier GmbH, Hamburg
07/2008-07/2009 Junior Business Development Manager der Eurofins Food I DE GmbH, Hamburg
08/2009-04/2011 Analytical Service Manager der Eurofins Global Control GmbH, Hamburg
05/2011-04/2012 Senior Analytical Service Manager der Eurofins Global Control GmbH, Hamburg
Seit 05/2012 Lebensmittelchemiker der Biofocus Gesellschaft für biologische Analytik mbH, Recklinghausen